

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/050479

International filing date: 04 February 2005 (04.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 102004005885.7
Filing date: 05 February 2004 (05.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 19 May 2005 (19.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

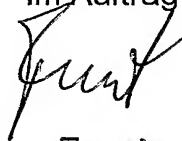


**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 005 885.7
Anmeldetag: 05. Februar 2004
Anmelder/Inhaber: RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN, 53113 Bonn/DE
Bezeichnung: Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter
Fehlpaarungs-Diskriminierung
IPC: C 12 N, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. April 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Faust

040123de/JH/BM

Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter Fehlpaarungs-Diskriminierung

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Polymerasen mit einer speziellen Mutation, die eine erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweisen, deren Herstellung und Verwendung. Die thermostabilen DNA-Polymerasen mit dieser Mutation sind besonders für diagnostische und molekularbiologische Verfahren, z.B. allelspezifische PCR geeignet.

Hintergrund der Erfindung

Seit der Vorstellung der ersten menschlichen Genomsequenzen konzentriert sich die Forschung auf die Entdeckung genetischer Unterschiede zwischen den Individuen wie z.B. Einzelbasenmutationen ("single nucleotide polymorphisms" SNP's). Dies ist von Interesse, da zunehmend ersichtlich wird, dass Einzelbasenvariationen im Genom mit unterschiedlicher Arzneimittelverträglichkeit oder Prädisposition für verschiedenste Krankheiten verknüpft sind. In Zukunft könnte die Kenntnis medizinisch relevanter Nukleotidvariationen es ermöglichen, Therapien auf die individuelle genetische Ausstattung anzupassen und die Behandlung mit Medikamenten, die ineffektiv sind oder sogar zu Nebenwirkungen führen, könnte verhindert werden (Shi, Expert Rev. Mol. Diagn. 1, 363-365 (2001)). Es ist offensichtlich, dass Entwicklungen, die eine zeit- und kosten-effiziente Identifizierung von Nukleotidvariationen ermöglichen, zu weiteren Fortschritten in der Pharmakogenetik führen.

SNPs machen den größten Teil der genetischen Variationen im menschlichen Genom aus, und sind die Ursache für über 90% der Unterschiede zwischen Individuen (Kwok, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet 2, 235-258 (2001); Kwok und Chen, Curr. Issues Mol. Biol. 5, 43-60 (2003); Twyman and Primrose, Pharmacogenomics 4, 67-79 (2003)). Zum Nachweis solcher genetischer Variationen und anderer Nukleinsäure-Varianten wie Mutationen können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Beispielsweise kann die Identifikation der Variante einer Target-Nukleinsäure durch Hybridisation der zu analysierenden Nukleinsäure-Probe mit einer Sequenzvarianten-spezifischen Hybridisationssonde unter geeigneten Hybridisationsbedingungen erfolgen (Guo et al., Nat. Biotechnol. 15, 331-335 (1997)).

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass derartige Hybridisierungsmethoden, insbesondere den klinischen Anforderungen hinsichtlich der erforderlichen Sensitivität derartiger Assays, nicht genügen. Deshalb hat zum Nachweis von Mutationen, Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) sowie anderen allelischen Sequenzvarianten insbesondere auch die PCR (Saiki et al., Science 239, 487-490 (1988)) breiten Eingang in molekular-biologische und diagnostische Untersuchungsverfahren gefunden, wobei eine im Hinblick auf die Existenz einer Variante zu untersuchende Target-Nukleinsäure durch eine Polymerase-Kettenreaktion vor der Hybridisierung amplifiziert wird. Als Hybridisationssonden für derartige Assays werden in der Regel einzelsträngige Oligonukleotide verwendet. Eine abgewandelte Ausführungsform dieser Assays sind solche, die fluoreszierende Hybridisationssonden einsetzen (Livak, Genet Anal. 14, 143-149 (1999)). Generell wird angestrebt Verfahren zur Bestimmung SNPs und andern Sequenzvariationen zu automatisieren (Gut, Hum. Mutat. 17, 475-492 (2001)).

Eine bereits im Stand der Technik bekannte Alternative zur Sequenzvariantenspezifischen Hybridisierung bietet die sogenannte Allel-spezifische Amplifikation (Newton et al., Nucleic. Acids Res. 17, 2503-2516 (1989); Germer et al., genome res. 10, 258-266 (2000); Gibbs et al., Nucleic. Acids Res. 17, 2437-2448 (1989); Wu et al., PNAS 86, 2757-2769 (1989); Ishikawa et al., Hum. Immunol. 42, 315-318 (1995)). Bei diesem Nachweisverfahren werden bereits während der Amplifikation Varianten-spezifische Amplifikationsprimer eingesetzt, die in der Regel am 3' terminalen Ende des Primers einen sog. diskriminierenden terminalen Nukleotidrest besitzen, welcher lediglich komplementär zu nur einer speziellen Variante der nachzuweisenden Target-Nukleinsäure ist. Bei dieser Methode werden Nukleotidvariationen durch die An- oder Abwesenheit von DNA Produkt nach der PCR Amplifikation bestimmt. Das Prinzip der Allel-spezifische Amplifikation basiert auf der Ausbildung von kanonischen oder nicht kanonischen Primer-Template Komplexen am Ende von allel-spezifischen Primersonden. An einem korrekt gepaarten 3'-Primerende kann die Amplifikation durch eine DNA-Polymerase stattfinden, bei einem fehlgepaarten Primerende hingegen sollte die Verlängerung gehemmt sein.

US 5,595,890 beschreibt beispielsweise derartige Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation sowie deren Anwendung zum Nachweis von klinisch relevanten Punktmutationen, beispielsweise im k-ras-Onkogen. US 5,521,301 beschreibt ebenfalls Verfahren zu Allel-spezifischen Amplifikation zur Genotypisierung des

ABO-Blutgruppensystems. US 5,639,611 offenbart dagegen die Verwendung Allel-spezifischer Amplifikation im Zusammenhang mit dem Nachweis der für Sichelzell-Anämie verantwortlichen Punktmutation.

Die Allel-spezifische Amplifikation ist jedoch insofern problematisch, das sie sich durch eine nur geringe Selektivität aufzeichnet, wodurch weitere, aufwendige und damit zeit- und kostenintensive Optimierungsschritte bedingt werden.

Derartige Verfahren zum Nachweis von Sequenzvarianten, Polymorphismen und vor allem Punktmutationen erfordern insbesondere dann eine Allel-spezifische Amplifikation, wenn sich die nachzuweisende Sequenzvariante im Unterschuss verglichen mit einer im Überschuss vorhandenen Variante desselben Nukleinsäureabschnitts (bzw. desselben Gens) befindet.

Eine derartige Situation ist beispielsweise dann gegeben, wenn mit Hilfe von Allel-spezifischer Amplifikation disseminierte Tumorzellen in Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma nachgewiesen werden soll (US 5,496,699). Zu diesem Zweck wird zunächst DNA aus Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma isoliert, welche sich aus einem Unterschuss DNA an disseminierten Tumorzellen sowie einem Überschuss an DNA aus nicht proliferierenden Zellen zusammensetzt. Die für die tumorale DNA signifikanten Mutationen im k-Ras Gen müssen somit aufgrund von wenigen Kopien tumoraler DNA in Gegenwart eines Überschusses an Wildtyp DNA nachgewiesen werden.

Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation haben den Nachteil, dass trotz der Verwendung von 3' diskriminierenden Nukleotidresten eine Primerextension in Gegenwart einer geeigneten DNA Polymerase in geringerem Umfang auch dann erfolgt, wenn die Target-Nukleinsäure nicht exakt der nachzuweisenden Sequenzvariante entspricht, d. h., sich von dieser zumindest in dem zum diskriminierenden Nukleotidrest komplementären Nukleotid unterscheidet. Dies führt insbesondere dann zu falsch-positiven Ergebnissen, wenn eine bestimmte Sequenzvariante in einem Überschuss-Background von Nukleinsäuren enthaltend eine andere Sequenzvariante nachgewiesen werden soll. Dies ist wie oben erwähnt beispielsweise bei der Detektion von bestimmten k-Ras-Allelen als Indikator für disseminierte Tumorzellen der Fall. Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren besteht darin, daß in jedem Falle ein 3' terminal diskriminierender Oligonukleotidrest verwendet werden muß. Maßgeblich für die Nachteile dieser auf PCR basierenden Verfahren ist die Unfähigkeit der in diesen Verfahren eingesetzten Polymerasen ausreichend zwischen Ba-

senfehlpaarungen zu diskriminieren. Bislang war es daher nicht möglich direkt durch PCR eine eindeutige Aussage über die An- bzw. Abwesenheit einer Mutation zu machen. Es bedarf bislang immer weiterer zeit- und kostenintensive Aufreinigungs- und Analyseverfahren für eine eindeutige Diagnose solcher Mutationen. Daher werden Neuerungen, die eine Erhöhung der Selektivität der Allel-spezifischen PCR Amplifikation ermöglichen, einen signifikanten Einfluss auf Verlässlichkeit und Robustheit der direkten SNP-Analyse durch die PCR.

Andererseits werden bereits eine Reihe von Modifikationen in der Proteinsequenz der DNA-Polymerasen I beschrieben. So erwähnt das US-Patent 6,329,178 DNA-Polymerasemutanten mit geänderter katalytischer Aktivität, bei denen Mutationen in dem A-Motiv (der hochkonservierten Sequenz DYSQIELR) erfolgt waren. Darüber hinaus beschreibt Minnick, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 3067 – 3075 (1999) eine Vielzahl von *E.-coli*-DNA-Polymerase-I-(Kleenow-Fragment)-Mutanten, bei denen Alaninaustausche vorgenommen wurde. Ein Teil der beschriebenen Mutanten zeigt eine höhere Polymerase-Genauigkeit, bezogen auf den Wildtyp. Eine der erwähnten Mutanten ist H881A; besondere Eigenschaften dieser Mutanten in Bezug auf die anderen beschriebenen Mutanten werden nicht aufgeführt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, Sequenzvarianten mit erhöhter Spezifität bereitzustellen, mit deren Hilfe ein Sequenzvarianten-spezifisches Nachweisverfahren ermöglicht wird.

Kurzbeschreibung der Erfindung

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass spezielle Mutanten von DNA-Polymerasen der Familie A, nämlich solche, in denen das konservierte C-Motiv und insbesondere dessen QHV-Aminosäuresequenz modifiziert wurde, eine erhöhte Fehlerpaarungs-Diskriminierung aufweisen, und in Nachweisverfahren für Sequenzvarianten einsetzbar sind. Die thermostabilen Varianten hiervon sind zur allelspezifischen PCR geeignet. Die vorliegende Erfindung betrifft im Einzelnen (1) eine DNA-Polymerase der Familie A, die eine modifizierte Motiv-C-Sequenz und eine, im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyppolymerase, erhöhte Fehlerpaarungs-Diskriminierung aufweist, oder ein Klenow-Fragment derselben;

- (2) eine DNA-Sequenz die die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß Ausführungsform (1) codiert;
- (3) ein Vektor, der die DNA-Sequenz gemäß Ausführungsform (2) enthält;
- (4) eine Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Ausführungsform (3) transformiert ist und/oder eine DNA gemäß Ausführungsform (2) aufweist;
- (5) ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß der Ausführungsform (1), umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle Ausführungsform (4) und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand;
- (6) die Verwendung der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments gemäß Ausführungsform (1) in diagnostischen und molekularbiologischen Verfahren, einschließlich allel-spezifischer PCR, DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung usw.;
- (7) ein Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe unter Verwendung einer DNA-Polymerase gemäß der Ausführungsform (1); und
- (8) ein Kit zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe gemäß des Verfahrens nach Ausführungsform (7) enthaltend wenigstens eine DNA-Polymerase gemäß Ausführungsform (1).

Kurzbeschreibung der Figuren

Figur 1: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (SEQ ID NO: 2) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex (Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TX-3', X= A, G, C oder T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG CYA GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y= A, G, C oder T (SEQ ID NO:12), 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100).

Figur 2: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-

Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (bezogen auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment aus *E. coli*) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex [a: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:14); Matrizen: 5'-GGT CTA GCT ACA G \underline{X} G AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3', X = A oder T (SEQ ID NO:15); b: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15); Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA C \underline{X} T AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3', X = A oder G (SEQ ID NO:16)], 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100).

Figur 3: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in QVH - Motiv in Taq DNA-Polymerase I auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex [a: Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC T \underline{X} -3', X= T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG C \underline{Y} A GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y = A oder G (SEQ ID NO:12); b: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:13); Matrize: 5'-GGT CTA GCT ACA G \underline{X} G AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3', X = A oder T (SEQ ID NO:14); c: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15); Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA C \underline{X} T AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3', X = A oder G (SEQ ID NO:16)], 1mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 0.6 ng DNA-Polymerase. Inkubation bei 37 °C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20).

Figur 4: Real-time PCR Experimente mit Taq (wt) (SEQ ID NO:4) und LVL-Mutante (SEQ ID NO:4 mit LVL in Positionen 782 – 784). Die Experimente wurden mittels einem *iCycler* (BIORAD) System durchgeführt. Typische Reaktion in 20 µl enthielt: 40 pM der betreffenden Matrize in Taq DNA-Polymerase Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20, 0.3 mM dNTPs) 0.5 µM der beiden Primer und 95 ng Taq DNA-Polymerase und eine 1/50.000 von *SybrGreen I* 10.000x-Lösung in DMSO (*Molecular Probes*). Die PCR wurde mit folgendem Programm Zyklen bei 95°C für 30 s, 55°C für 35 s und 72°C für 40 s. Reaktionen 1w, 2w, 3w und 4w wurden mit dem

Wildtyp-Enzym, 1m, 2m, 3m und 4m mit der LVL-Mutante durchgeführt. DNA-Sequenzen:

a: Primersonde: 5'-d(GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T) (SEQ ID NO:19); Reverse Primer: 5'-d(AGA GGA AAG ATG AAG TAC TAT G) (SEQ ID NO:20); Matrize: 5'-d(CAA CTG TTC AAA CTG ATG GGA CCC ACT CCA TCG AGA TTT CXC TGT AGC TAG ACC AAA ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TTC ATG AAG AAA TAT ATC TGA GGT GTA GTA AGT AAA GGA AAA CAG TAG ATC TCA TTT TCC TAT CAG AGC AAG CAT TAT GAA GAG TTT AGG TAA GAG ATC TAA TTT CTA TAA TTC TGT AAT ATA ATA TTC TTT AAA ACA TAG TAC TTC ATC TTT CCT CT), X= A (wildtyp)(1) oder T (Mutante)(2) (SEQ ID NO:21).

b: Primersonde: 5'-d(GTT TTA GAT GT TAA ATC ACA CTT AT) (SEQ ID NO:22); Reverse Primer: 5'-d(AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AG) (SEQ ID NO:23); Matrize: 5'-d(AAA ATG TGA GAA GGG ACC TCA TAA AAT ATG TCA TAT GGA AAT GAG CAG ATA ATA AAG ATT ATA GCT TTT CTT TGT CAA AAG GAG ACT CAA TAT CTT TAC TCT TTC ATC AGG ACA TTG TGA CAA ATG TTT CCC CCA GAA TCA TCC GGG GAA CCA CCT CTG GCC CCA TGT ATG GCC CTG GAC AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AGC TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT ATT GGT GTC AAA GTG TCA CTG AAC TAA AGG CTG ACT TTC CAG ACA ACX TAA GTG TGA TTT AAC ATC TAA AAC), X= A (wildtyp)(3) oder G (Mutante)(4) (SEQ ID NO:24).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mutierte DNA-Polymerasen der Familie A mit erhöhter Fehlpaarungs-Diskriminierungsfähigkeit, oder Klenow-Fragmente derselben. Die erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierungsfähigkeit - worunter eine hohe Selektivität gemäß der Watson-Crick-Regeln beim Einbau von komplementären Basen, wie auch schon der Anlagerung eines Primers an die Matrize zu verstehen ist, d. h. ein größeres Verlängerungsselektivitätsverhältnis ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$) als die entsprechende Ausgangspolymerase (Wildtyp) aufweist (z. B. bestimmt in dem Fluoreszenz-Testsystem gemäß Beispiel 2) - kann durch Mutation einer bestimmten Aminosäuresequenz in natürlichen Enzymen erreicht werden. Die dadurch bedingten Eigenschaften der DNA Polymerasen übertreffen die der "State-of-the-art" Wildtyppolymerasen, wie sie derzeit kommerziell vertrieben werden. Die Erhöhung der Selektivität der Aktivität von DNA-Polymerasen ermöglicht verlässlichere Systeme zum Nachweis von Mutationen oder Polymorphismen, die direkte Diagnose durch allel-spezifische PCR ohne nachge-

schaltete zeit- und kostenintensive Aufreinigungs- und Analyseverfahren und hohe Nachhaltigkeit, da keine chemischen modifizierten Primer verwendet werden müssen.

Nachfolgend Definitionen sind auf die gesamte Anmeldung anzuwenden, sind aber nicht limitierend zu verstehen. "DNA-Polymerasen der Familie A" (auch Polymerasen I genannt) sind solche DNA-polymerisierenden Enzyme, die das A-Motiv mit der Sequenz DYSQIELR in ihrem aktiven Zentrum aufweisen. Es zählen dazu auch die hier beschriebenen Enzyme, die Mutationen im C-Motiv aufweisen. Insbesondere zählen zu diesen auch thermostabile DNA Polymerasen, sowie deren Mutanten.

Unter dem Begriff "Klenow-Fragment" wird ein jedes C-terminale Fragment einer DNA Polymerase der Familie A verstanden, das sowohl Polymeraseaktivität wie auch 3'→5' Exonukleaseaktivität (aber keine 5'→3' Exonukleaseaktivität) besitzt.

Unter "Vektoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Plasmide, Cosmide, Phagemide, und Viren zu verstehen, die neben einer DNA von Interesse (wobei es sich insbesondere um erfindungsgemäße Sequenzen von DNA Polymerasen aus der Familie A handelt) auch Kontrollelemente, die die Expressierung der DNA von Interesse steuern, umfassen.

Unter den Begriff "Wirtszellen" fallen sowohl prokaryontische Zellen, wie *E. coli* (insbesondere *E. coli* XL1-blue, DH5α, BL21 (DE3), M15 [pREP4], SG13005 [pREP4], BL21 (DE3) pLysS), *Halomonas elongata*, *Caulobacter sp.*, *Halobacterium halobium* usw., als auch eukaryontische Zellen, wie Hefe- und andere Pilzzellen, pflanzliche und tierische Zellen, einschließlich isolierter menschlicher Zellen, die sich in Zellkultur befinden. Des Weiteren werden unter dem Begriff „Wirtszelle“ auch Zellextrakte verstanden, die bei Vorlage einer mRNA diese translatieren können, wie Weizenkeimextrakt (wheat germ extract) als auch Kaninchen Reticulocytenextrakt (Rabbit reticulocyte extract, (RRL)). Weiterhin werden hier auch *in vitro* Expressionssysteme als „Wirtszelle“ verstanden, wie z. B. das T7 Expression System, pBAD Expression System, ThioFusion™ Expression Systems, trc Expression System, PL Expression System, PurePro™ *Caulobacter* Expression System, Microbiological Media and Media Components, Qiagen pQE Expression System und das Novagen pET Expression System usw.

Ausführungsform (1) der Erfindung betrifft DNA-Polymerasen der Familie A oder deren Klenow-Fragment, die sich von natürlich vorkommenden DNA-Polymerasen dadurch unterscheiden, dass sie eine erhöhte Fehlpaarungsdiskriminierung auf-

weisen, was zu einer erhöhten Selektivität der Enzymaktivität führt. Die erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen leiten sich von bakteriellen DNA-Polymerasen, wie Polymerasen von *E. coli*, *Aquifex*, *Borielia*, *bacillus*, *Chlamydia*, *Chlamydo-phila*, *chloroflexus*, *Haemophilis*, *Heliobacter*, *Lacococcus*, *Methylobakterium*, *Mycobakterium*, *Rhodothermus*, *Rickettsia*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Syncechocysts*, *Treponema* usw., insbesondere jedoch auch von Polymerasen thermotabiler Organismen wie *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis*, *Rhodothermus obamensis*, *Bacillus stearothermophilus* usw. ab. Bei den erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen oder deren Klenow-Fragmente sind dabei insbesondere in der Motiv-C-Sequenz QVH in Positionen 879 – 881 (in Bezug auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aus *E. coli*) wenigstens ein Aminosäurerest, vorzugsweise das Q und/oder das H, durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt.

"Lipophile Aminosäurereste" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen die Aminosäurereste Gly, Ala, Val, Leu, Met, Phe, Trp, Ile, Pro usw. Bevorzugte Reste sind dabei Gly, Ala, Val, Leu und Ile. Im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Motiv-C-Sequenz QVH vorzugsweise durch die Sequenzen LVL, LVG, QVL, PIL, QVV, LVA, LAA, LVV, LVI, IVI, III, VVV, QVV, QVA usw. ersetzt, wobei ein Austausch durch LVL und LVG besonders bevorzugt ist.

Neben dem vorstehend genannten Austausch kann die erfindungsgemäße Polymerase noch weitere Mutationen wie z. B. Deletionen, Substitutionen und/oder Additionen (jeweils bis zu 20 Aminosäureresten) aufweisen, vorausgesetzt dass dadurch das größere Verlängerungsverhältnis ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$), bezogen auf den Wildtyp, nicht beeinträchtigt wird. Zu den Substitutionen zählen dabei insbesondere weitere (vorzugsweise konservative) Austausche in der Motiv-C-Sequenz, die neben dem oben aufgeführten Ersetzen wenigstens eines Restes in QVH durch einen lipophilen Aminosäurerest erfolgen. So umfasst die vorliegende Erfindung insbesondere auch solche DNA-Polymerasen, die eine Aminosäuresequenz LVN, LYH, PLQ, LVQ, QDL, QEL, QUV usw. an der Stelle von QVH im C-Motiv enthalten.

Darüber hinaus wurde gefunden, dass auch eine DNA-Polymerase mit der Sequenz QVN anstelle von QVH im C-Motiv ein größeres Verlängerungsverhältnis ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$), bezogen auf den Wildtyp, aufweist.

Weiterhin beinhaltet die Erfindung eine Taq-Polymerase deren QVH Sequenz wie vorstehend beschrieben ausgetauscht wurde. Besonders bevorzugt sind dabei solche Taq-Polymerase deren QVH Sequenz durch LVL oder LVG ausgetauscht wurden (in Bezug auf die in SEQ ID NO:4 gezeigte Taq Polymerase Proteinsequenz sind die Positionen 782-784 vom Austausch betroffen).

Bei den erfindungsgemäßen Klenow-Fragmenten ist es bevorzugt, dass wenigstens zwei Aminosäurereste in QVH durch lipophile Aminosäurereste ersetzt sind. Besonders bevorzugt unter den vorstehend genannten Sequenzen mit zwei Austauschen sind – auch für die Klenow-Fragmente – LVL und LVG.

Die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen wurde somit an einer oder mehreren Stellen verändert im Vergleich zu den DNA-Wildtyppolymerasen, und dies spiegelt sich auch auf Nukleinsäureebene wieder. Erfindungsgegenstand ist auch eine DNA Sequenz, die für eine der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen oder deren Klenow-Fragment codiert (Ausführungsform (2) der Erfindung). Ebenso ist ein Vektor, der die DNA-Polymerase (1) codierende DNA Sequenz enthält, sowie eine Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert ist, der die DNA-Polymerase (1) codierende DNA Sequenz enthält, und/oder die eine die DNA-Polymerase (1) codierende DNA aufweist, Gegenstand der Erfindung. Ebenfalls Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment, welches das Kultivieren der transformierten Wirtszelle und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand umfasst.

Thermostabile DNA-Polymerasen gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung haben eine höhere Selektivität in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und diskriminieren besser zwischen einzelnen Fehlpaarungen und kanonischen Komplexen als natürlich vorkommende DNA-Polymerasen. Dies bedingt verbesserte Eigenschaften der Mutanten im Einsatz von diagnostischen (Allel-spezifische PCR) und molekularbiologischen (DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung) Verfahren. Verfahren in denen die erfindungsgemäße DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment eingesetzt werden kann, sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die DNA-Polymerase gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung ist auch in einem Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von Sequenzvarianten in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe einsetzbar (Ausführungsform (7)). Solch ein Verfahren umfasst vorzugsweise einen oder mehrere der folgenden Schritte:

- a) Zugabe von
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten,
 - einer der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen
 - mindestens einem diskriminierenden Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei für jede nachzuweisende Sequenzvariante einer Target-Nukleinsäure ein Primer zugegeben wird, welcher eine Sequenz komplementär zur nachzuweisenden Sequenzvariante aufweist, und wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3' terminalen-, 3' proxi-terminalen-, oder 3' proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest des diskriminierenden Primers ist,
 - mindestens einem weiteren Primer, der komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension eines diskriminierenden Primers ist
- b) Durchführung einer Primer-Extensionsreaktion, wobei ein Verlängerungsprodukt des diskriminierenden Primers im Wesentlichen nur dann erhalten wird, wenn die Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält
- c) Trennung des Produkts der Primer-Extensionsreaktion von der Template Nukleinsäure
- d) Zyklische Wiederholung der Schritte b) und c) zum Erhalt eines Amplifikationsproduktes, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion
- e) Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer Sequenzvariante aufgrund der An- oder Abwesenheit des Amplifikationsproduktes.

In diesem Zusammenhang sind die für die Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Begriffe wie folgt zu verstehen:

Eine "erfindungsgemäße DNA Polymerase" ist dabei eine wie vorstehend definierte DNA-Polymerase der Familie A, die das A-Motiv mit der Sequenz DYSQIELR in ihrem aktiven Zentrum aufweist und bestimmte Mutationen im C-

Motiv besitzt. Insbesondere zählen zu diesen auch thermostabile DNA Polymerasen mit Mutationen im C-Motiv. Bei den Mutationen handelt es sich um konservative Substitutionen der QVL Aminosäurereste des C-Motivs und/oder die vorstehend definierten nicht-konservierende Substitutionen.

Eine "thermostabile DNA Polymerase" ist eine Polymerase die auch bei Temperaturen von über 42°C funktionsfähig ist, und insbesondere bei auf PCR basierenden Amplifikationsverfahren eingesetzt werden kann.

Insbesondere fallen unter den Begriff „Extensionsreaktionen“ Reaktionsgemische die wenigstens eine Polymerase, Nukleotide, eine Matrize(n) und Primer umfassen. Die Reaktionsbedingungen sind so gewählt, dass der/die Primer sich an die Matrize anlagern kann/können, und die Polymerase die Verlängerung des/der Primers durch Einbau von matrizenkomplementären Nukleotiden katalysiert. Als Produkt entsteht ein Primerextensionsprodukt.

Eine "Target-Nukleinsäure" ist ein Nukleinsäure-Abschnitt aus einer biologischen Probe, deren Sequenz mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens näher analysiert werden soll. Die biologische Probe besteht dabei in der Regel aus genomischer DNA. Ebenso gut ist das erfindungsgemäße Verfahren jedoch für die Analyse von RNA-Sequenzvarianten geeignet (?). Es ist dabei unerheblich, ob die Probe aus zellulärem Material oder biologischen Flüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin oder Speichel isoliert wurde.

Unter einer "Sequenzvariante" im Sinne der Erfindung ist eine Target-Nukleinsäure mit einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz zu verstehen, die sich von Sequenzen anderer möglicher Target Nukleinsäuren nur minimal unterscheidet, und bedingt durch diese minimalen Unterschiede identifizierbar ist. Dabei betreffen die Sequenzunterschiede vorzugsweise zwischen ein und drei aufeinander folgende Nukleotidreste. Besonders geeignet ist die vorliegende Erfindung zur Identifikation von Sequenzvarianten betreffend nur einem einzelnen Nukleotidrest (SNP). Dabei kann es sich sowohl um einen Basenaustausch, aber alternativ auch um Nukleotidadditionen bzw. -deletionen handeln. Auf diese Art können verschiedene Allele voneinander unterschieden werden. Punktmutationen oder Polymorphismen können so ebenfalls nachgewiesen werden. Unter einer Sequenzvariante werden somit insbesondere auch Punktmutationen oder Polymorphismen verstanden, die im Hinblick auf prognostische oder diagnostische Fragestellungen analysiert werden.

Bei einer Matrizen-abhängigen Polymerisation von Desoxynukleotid-triphosphaten erfolgt beginnend am 3'-Ende eines sogenannten Primers, welcher an eine einzelsträngige Template-Nukleinsäure hybridisiert ist, eine Polymerisation der Desoxynukleotidtriphosphate in der Weise, dass eine zur Target-Nukleinsäure komplementäre Sequenz entsteht. Derartige Polymerisationsreaktionen in 5'-3'-Orientierung werden vorzugsweise enzymatisch mit sog. DNA-Polymerasen, wie beispielsweise Klenow Polymerase, durchgeführt. Besonders bevorzugt sind thermostabile DNA-Polymerasen, wie z.B. Taq-Polymerase (Roche Applied Science Katalog Nr. 1146165).

Ein "diskriminierender Primer" im Sinne der Erfindung ist ein Primer, dessen Sequenz exakt komplementär zu einer bestimmten Sequenzvariante ist, wobei diese Sequenz bestimmte Unterschiede zu einer anderen Sequenzvariante aufweist, welche sich in der zu analysierenden Probe befinden kann. Als "diskriminierender Nukleotidrest" wird in diesem Zusammenhang ein Nukleotidrest verstanden, dessen Komplement in den verschiedenen existierenden Sequenzvarianten von unterschiedlichen Nukleotidresten gebildet wird.

Der "3'-terminale Nukleotidrest" ist derjenige Nukleotidrest, der sich an dem terminalen Ende eines Oligonukleotidprimers befindet, das eine freie 3'-OH-Gruppe besitzt. Der "proxy-terminale Nukleotidrest" ist derjenige Nukleotidrest eines Oligonukleotidprimers, dessen Ende über eine Phosphatgruppe mit dem 5'-Ende des terminalen Nukleotidrestes verbunden ist. Als proxy-proxy-terminaler Nukleotidrest wird derjenige Nukleotidrest bezeichnet, dessen 3'-Ende über eine Phosphatgruppe mit dem 5'-Ende des proxy-terminalen Nukleotidrests verknüpft ist.

Wie aus der oben stehenden Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens hervorgeht, handelt es sich bei den Schritten a)-e) im Wesentlichen um eine Amplifikationsreaktion, die abhängig von der An- oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenzreaktion zu einem Amplifikationsprodukt führt. Derartige Verfahren können deshalb nach aus dem Stand der Technik bekannten Protokollen für PCR-Reaktionen durchgeführt werden.

Gegenstand der Erfindung ist in diesem Zusammenhang auch ein Kit, enthaltend Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein derartiger Kit enthält insbesondere eine erfindungsgemäße DNA-Polymerase. Wahlweise kann ein derartiger Kit zusätzliche Komponenten enthalten wie beispielsweise einen

oder mehrere (diskriminierende) Primer, Desoxynukleotidtriphosphat, Puffer, Quantifizierungsreagenzien, insbesondere interkalierende Reagenzien oder in der kleinen Furche anbindende Reagenzien, wobei besonders bevorzugt Reagenzien aus der Gruppe von PicoGreen (Molecular Probes), SybrGreen (Molecular Probes), Ethidiumbromid, Gelstar (Cambrex), Vista Green (Amesham) ausgewählt werden, Polymerase-blockierende Antikörper, insbesondere TaqBlock, sowie Mittel zur Template-abhängigen Polymerisation der Desoxynukleotidtriphosphate. Die einzelnen Komponenten des Kits können in verschiedenen Ausführungsformen wahlweise in einem Aufbewahrungsgefäß zusammen bzw. in zwei oder mehreren Aufbewahrungsgefäßen getrennt enthalten sein.

Wie aus den weiter unten aufgeführten Beispielen hervorgeht, sind die beobachteten Effekte hinsichtlich der Verbesserung der Spezifität gegenüber aus dem Stand der Technik verfügbaren Verfahren quantitativ eindeutig belegbar und führen dazu, dass unter PCR-Amplifikationsbedingungen Extensionsprodukte von Sequenzvarianten-spezifischen Primern in der Tat im Wesentlichen nur dann erhalten werden, wenn die zu analysierende Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält. Dieser spezifische Effekt kann durch Verbesserung und Optimierung der jeweiligen PCR-Parameter mit Hilfe von dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannten Maßnahmen optimiert und an die jeweils nachzuweisende Sequenzvariante adaptiert werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Hilfe von Real Time PCR. Bei dieser Methodik werden die Endprodukte der Amplifikationsreaktion nicht gelelektrophoretisch nachgewiesen, sondern der Verlauf der Amplifikationsreaktion wird mit Hilfe von geeigneten Fluoreszenz-markierten Hybridisierungssonden verfolgt, so dass kinetische Echtzeitmessungen und Quantifizierungen möglich sind.

Bei den für die erfindungsgemäßen Verfahren einzusetzenden Hybridisationssonden handelt es sich in der Regel um einzelsträngige Nukleinsäuren wie einzelsträngige DNA oder RNA bzw. deren Derivate oder alternativ auch PNAs, die bei der Annealing Temperatur der Amplifikationsreaktion mit der Target-Nukleinsäure hybridisieren. Üblicherweise haben diese Oligonukleotide eine Länge von 20 bis 100 Nukleotiden.

Die Markierung kann abhängig vom genauen Detektionsformat an jeder beliebigen Ribose- oder Phosphatgruppe des Oligonukleotids eingeführt werden. Bevorzugt sind Markierungen am 5' und 3' Ende des Nukleinsäuremoleküls. Die Art der Markierung muß im Echtzeit-Modus der Amplifikationsreaktion detektierbar sein. Dies ist beispielsweise nicht nur mit Fluoreszenzmarkierungen möglich, sondern alternativ auch mithilfe von Markierungen, die nach dem Prinzip der NMR detektierbar sind.

Dabei sind viele verschiedene Testführungen möglich. Als besonders geeignet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung haben sich die folgenden drei Detektionsformate erwiesen:

1. FRET-Hybridisationssonden: Für dieses Testformat werden 2 einzelsträngige Hybridisationssonden gleichzeitig verwendet, die komplementär zu benachbarten Stellen desselben Strangs der amplifizierten Target-Nukleinsäure sind. Beide Sonden sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzkomponenten markiert. Bei Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge einer ersten Komponente überträgt diese nach dem Prinzip des Fluoreszenzresonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, sodass bei Bindung beider Hybridisationsproben an benachbarte Positionen des nachzuweisenden Target-Moleküls eine Fluoreszenzemission der zweiten Komponente gemessen werden kann. Alternativ können ein Fluoreszenz-markierter Primer und nur eine markierte Oligonukleotidsonde verwendet werden (Bernard et al., Analytical Biochemistry 235, 1001-107 (1998)).

2. TaqMan-Hybridisationssonden: Eine einzelsträngige Hybridisationssonde wird mit 2 Komponenten markiert. Bei Anregung der ersten Komponente mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, den sogenannten Quencher übertragen. Während des Annealing Schrittes der PCR Reaktion bindet die Hybridisationssonde an die Target-DNA und wird während der sich anschließenden Elongationsphase durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase degradiert. Dadurch werden die angeregte Fluoreszenzkomponente und der Quencher räumlich voneinander getrennt, sodass eine Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann.

3. Molecular Beacons: Diese Hybridisationssonden sind ebenfalls mit einer ersten Komponente und einem Quencher markiert, wobei sich die Markierungen vorzugsweise an den beiden Enden der Sonde befinden. In Lösung befinden sich beide Komponenten aufgrund der Sekundärstruktur der Sonde in räumlicher Nähe zueinander. Nach Hybridisierung an die Target-Nukleinsäure werden beide Komponenten von einander getrennt, sodass nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge die Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann (Lizardi et al., US 5,118,801).

In alternativen Ausführungsformen kann das jeweilige Amplifikationsprodukt erfindungsgemäß auch durch einen DNA-Bindefarbstoff nachgewiesen werden, welcher bei Interaktion mit doppelsträngiger Nukleinsäure nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge ein entsprechendes Fluoreszenzsignal emittiert.

Als besonders geeignet für diese Anwendung haben sich die Farbstoffe SybrGreen und SybrGold (Molecular Probes) erwiesen. Alternativ können auch interkalierende Farbstoffe verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und Abbildungen näher erläutert. Die beschriebenen Verfahren sind nicht als Einschränkung der Erfindung sondern als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beispiele

Beispiel 1: Aufbau einer Bibliothek und Reinigung von Klenow-Fragment-Varianten

Das Plasmid pQKF⁺ (Brakman, S., Nieckchen, P., ChemBioChem 2001, 2, 773-7; siehe auch das in SEQ ID NO:26 gezeigte äquivalente Plasmid pQE30) ermöglicht die Expression des N-terminalen 6-His-markierten Klenow-Fragments von *E.-coli*-DNA-Polymerase I (3'-5'exo⁻) unter der Kontrolle einer T5-Promotor/Doppel-lac-Operator-Sequenz. Die Einführung von Mutationen in die Motiv-c-Sequenz, die für Q879, V880 and H881 codiert, erfolgte durch eine zweistufige Megaprimer-Mutagenese. PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von PfuTurbo-DNA-Polymerase (Stratagene) und unter Standardbedingungen durchgeführt. Die erste PCR wurde mit einer dotierten Primerbibliothek durchgeführt (5'-GTA CGT ATG ATC ATG NNN NNN NNN GAT GAA CTG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:5), die so aufgebaut war, dass sie 40% Nichtwildtyp-Nucleotid auf jeder der neun Zielpositionen und einen 23mer-Downstream-Primer (5'-GCT AAT TAA GCT TGG CTG

CAG GC-3'; SEQ ID NO:6) enthielt, was ein 195mer-PCR-Produkt ergab. Die zweite PCR wurde unter Verwendung des Agarose-Gel-gereinigten 195mers und eines 24mer-Antisense-Primers (5'-TAC ATG GAC CTT TAC TTC GAA CGC-3' SEQ ID NO:7) durchgeführt und ergab ein 457-bp-Produkt, das mit Csp45I und HindIII verdaut und in pQKF einkloniert wurde. Die resultierende Plasmidbibliothek wurde in *E.-coli*-XL-1blue (Stratagene) transformiert, Klone wurden aus Agarplatten herausgesucht und getrennt über Nacht in 96-Napf-Platten gezüchtet, die Superbroth-Medium (100 µg/ml Ampicillin) enthielten. Klenow-Fragment-Varianten wurden parallel in 600-µl-Kulturen exprimiert, geerntet und lysiert, wobei man 96-Napf-Platten verwendete, wie es beschrieben ist. Die erhaltenen 300-µl-Lysate wurden mit 900 µl Aufbewahrungspuffer (50mM Tris-HCl pH 7.3, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Aprotinin) verdünnt, zentrifugiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für Primerverlängerungsreaktionen und kinetische Messungen im stationären Zustand wurden Klenow-Fragment und ausgesuchte Mutanten exprimiert, wie es oben beschrieben ist, und unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gereinigt, wobei die Vorschriften des Herstellers befolgt wurden, aber das Imidazol im Lyse- und Waschschrift weggelassen wurde. Die erhaltenen Enzyme waren >95% rein, was durch SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung bestätigt wurde. Nach Austausch des Puffers (gegen 100 mM K₂HPO₄, 1 mM DTT pH 6.5 mit 50% Glycerin) wurden Konzentrationen unter Verwendung des Nanoorange-Assays (Molecular Probes) gemessen und auf 1 µg/µl eingestellt.

Beispiel 2: Durchmusterung (Screening)

Die Reaktionsgemische für die Durchmusterung der Bibliothek enthielten 150 nM Matrize, 225 nM Primer, 50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton X-100 und jeweils 200 µM dNTP. Die Reaktionen umfassten den 20mer-Primer FVL20TH (5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3'; SEQ ID NO:8), der so gestaltet ist, dass er mit der 3'-terminalen Base an das humane SNP G1691A bindet, das an der Faktor-V-Leiden-Mutation beteiligt ist. Für Messungen von Paarungsverlängerungseffizienzen wurde die 90mer-Matrize TFVL90A (5'-GAC ATC ATG AGA GAC ATC GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC TGT AAG AGC AGA TCC CTG GAC AGG CAA GGA ATA CAG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:9), die für das mutante Allel 1691A des humanen Faktor-V-ORF codiert, verwendet, was zu einem TA-Basenpaar am 3'-Terminus des Primers führte. Um Zugang zu Aktivitäten von Klenow-Varianten zu erhalten, die einen fehlgepaarten

Primerterminus prozessieren, wurde die 90mer-Matrize TFVL90G (5'-GAC ATC ATG AGA GAC ATC GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC TGT AAG AGC AGA TCC CTG GAC AGG CGA GGA ATA CAG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:10) verwendet, die für das entsprechende Wildtyp-Allel 1691G codiert, was zu einer TG-Fehlpaarung am 3'-Primerterminus führte. Beide Reaktionen wurden für jedes Element der Bibliothek parallel durchgeführt, um eine Bewertung der Aktivitätsverhältnisse als Verlängerungsselektivitäten zu ermöglichen. 10 µl der Reaktionsgemische wurden in schwarze 384-Napf-Platten ausgegeben, die auf 37 °C vorgewärmt wurden, wobei man eine automatische Flüssigkeitshandhabungsvorrichtung (Hamilton Microlab Star) verwendete, und anschließend wurden 5 µl Ly-satlösung hinzugefügt. Nach 10 min wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Stopplösung (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) abgebrochen, die 3.4x SYBRGrün I (Molecular Probes) für die Quantifizierung der von Klenow-Varianten erzeugten dsDNA enthielt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzplatten-Lesegeräts (Polarstar Optima, BMG Labtechnologies GmbH) mit Anregung bei 485 nm und Emission bei 520 nm quantifiziert. Die Verhältnisse der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$, willkürliche Einheiten) wurden zur Bestimmung der Verlängerungsselektivität herangezogen. Alle DNA-Polymerasen mit größerem Verlängerungsselektivitätsverhältnis ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$) als der Wildtyp wurden als Enzyme identifiziert, die eine erhöhte Verlängerungsselektivität besitzen.

Beispiel 3: Primerverlängerungsassays

Primer-Matrizensubstrate wurden assoziiert, indem man 5'-³²P-markierten Primer im spezifischen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100) mit der doppelten Menge Matrize mischte. Das Gemisch wurde 5 min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend über 1 h auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Nach der Assoziation wurden dNTP hinzugefügt, und die Lösung wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. 15 µl Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enzymlösung in 1x Reaktionspuffer zu 10 µl Assoziationsmischung eingeleitet, und es wurde 10 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Assays beinhalteten 150 nM Primer, 225 nM Matrize, jeweils 1 mM dNTP und 590 nM Enzym in geeignetem Reaktionspuffer. Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Gelbeladungspuffer (80% Formamid, EDTA, 20 mM) abgebrochen, und die Produktgemische wurden durch 14% de-

naturierendes PAGE analysiert (siehe Fig. 1 und 2). Die folgenden Primer- und Matrizensequenzen wurden im Zusammenhang mit verschiedenen SNPs (Positionen unterstrichen) eingesetzt:

Humane genomische Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz: Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3' (SEQ ID NO:11), Wildtypmatrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC GAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12), mutante Matrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC AAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12).

Humane somatische BRAF-T1796A-Mutation: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:13), Wildtypmatrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GIG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3' (SEQ ID NO:14), mutante Matrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GAG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3' (SEQ ID NO:14).

Humane Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15), Wildtypmatrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CGT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3' (SEQ ID NO:16), mutante Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CAT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3' (SEQ ID NO:16).

Humane saure Ceramidase Mutation A107G: Primer: 5'-CGT TGG TCC TGA AGG AGG AT-3' (SEQ ID NO:17), Wildtypmatrize: 5'-AAA TCA ACC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3' (SEQ ID NO:18), mutante Matrize: 5'-AAA TCA ACC TGT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3' (SEQ ID NO:18).

Beispiel 4: Klonieren von Taq-DNA-Polymerase

Das Plasmid pTTQ18::*Taq* (SEQ ID NO: 25) wurde von Engelke *et al.* (Anal. Biochem.1990, 191, 396-400 (1990)) konstruiert und ermöglicht die Expression von *Taq*-DNA-Polymerase unter der Kontrolle einer *Ptac*-Promotor/*lac*-Operator-Sequenz. Die LVL-Mutation wurde durch PCR in das *Taq*-QVH-Motiv eingeführt, wobei man den QuikChange®-Kit von *Stratagene* verwendete. Das resultierende mutante Plasmid und das Wildtypplasmid wurden in *E.-coli*-XL1-Blue (*Stratagene*) transformiert. Klone wurden herausgesucht und über Nacht in 20 ml Superbroth (100 µg/ml Carbenicillin) gezüchtet. Die Expression der *Taq*-Klone wurde in Kulturen in 1 l Superbroth (100 µg/ml Carbenicillin) durchgeführt, und die Zellen wurden nach 16 h Induktion mit 1 mM IPTG geerntet. Die Reinigung der *Taq*-DNA-Polymerase wurde so durchgeführt, wie es von Engelke *et. al* (Anal. Biochem.1990, 191, 396-400) beschrieben wird. Anstelle der Reinigung durch Ionenaustausch wurde eine Gelfiltration unter Verwendung einer Säule mit

Sephadex®-75 (Amersham) angewendet. Die erhaltenen Enzyme waren zu >90% rein, was durch SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung bestätigt wurde. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung des Nanoorange-Assays (Molecular Probes) und SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung gemessen.

Beispiel 5: Primerverlängerung mit Katalyse durch Taq-DNA-Polymerase

Primer-Matrizensubstrate wurden assoziiert, indem man 5'-³²P-markierten Primer im spezifischen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25 °C), 16 mM Ammoniumsulfate und 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20) mit der doppelten Menge Matrize mischte. Das Gemisch wurde 10 min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend über 1 h auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Nach der Assoziation wurden dNTP hinzugefügt, und die Lösung wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. 15 µl Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enzymlösung in 1x Reaktionspuffer zu 10 µl Assoziationsmischung eingeleitet, und es wurde 10 min lang bei 72 °C inkubiert. Die Assays beinhalten 150 nM Primer, 225 nM Matrize, jeweils 1 mM dNTP und 0,5 ng Taq-LVL-DNA-Polymerase (mutante Polymerase) und 0.06 ng Taq-DNA-Polymerase in geeignetem Reaktionspuffer. Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Gelbeladungspuffer (80% Formamid, EDTA, 20 mM) abgebrochen, und die Produktgemische wurden durch 14% denaturierendes PAGE analysiert (siehe Figur 3). Bezüglich der Primer- und Matrizensequenzen, die im Zusammenhang mit den SNPs humane genomische Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz, humane somatische BRAF-T1796A-Mutation und humane Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A verwendet wurden, wird auf Beispiel 3 verwiesen.

Beispiel 6: Echtzeit-PCR-Experimente

Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung eines *iCycler*-Systems (BIORAD) durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, das 4 pM der jeweiligen Matrizen in Taq-DNA-Polymerase-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25 °C), 16 mM Ammoniumsulfat und 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween 20) enthielt. Die endgültigen Gemische enthielten dNTPs (jeweils 200 µM dATP, dGTP, dCTP und TTP), Primer (jeweils 0.5 µM der jeweiligen Primersonde und des umgekehrten Primers) und 13 ng Taq-DNA-Polymerase (SEQ ID NO:4), 95 ng DNA-Polymerase von Taq-LVL-Mutante (SEQ ID NO:4 mit LVL in Positionen 782 – 784) und eine wässrige 1/50.000-Verdünnung einer 10.000fachen Lösung

von *SybrGreen I* in DMSO (*Molecular Probes*). Alle PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt: Anfangsdenaturierung bei 95 °C während 3 min, dann 40 Cyclen Denaturierung bei 95 °C während 30 s, Primerassoziation bei 55 °C während 35 s und Verlängerung bei 72 °C während 40 s. Die vorgestellten Ergebnisse stammen von wenigstens dreimal wiederholten unabhängigen Messungen an drei Parallelansätzen, die aus einer Stammischung hervorgingen. Die Ergebnisse sind in Figur 4 zusammengefasst.

Die folgenden DNA-Sequenzen wurden eingesetzt:

Sequenzen im BRAF-Zusammenhang: Primersonde BraFT: 5'-d(GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T) (SEQ ID NO:19), umgekehrter Primer: 5'-d(AGA GGA AAG ATG AAG TAC TAT G) (SEQ ID NO:20), Zielmatrize BraFX: 5'-d(CAA CTG TTC AAA CTG ATG GGA CCC ACT CCA TCG AGA TTT C_XC TGT AGC TAG ACC AAA ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TTC ATG AAG AAA TAT ATC TGA GGT GTA GTA AGT AAA GGA AAA CAG TAG ATC TCA TTT TCC TAT CAG AGC AAG CAT TAT GAA GAG TTT AGG TAA GAG ATC TAA TTT CTA TAA TTC TGT AAT ATA ATA TTC TTT AAA ACA TAG TAC TTC ATC TTT CCT CT), X= A BraFA, X= T, BraFT (SEQ ID NO:21).

Sequenzen im DPyD-Zusammenhang: Primersonde DpyDT: 5'-d(GTT TTA GAT GT TAA ATC ACA CTT AT) (SEQ ID NO:22), umgekehrter Primer: (5'-d(AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AG) (SEQ ID NO:23), Zielmatrize DPyDX: 5'-d(AAA ATG TGA GAA GGG ACC TCA TAA AAT ATG TCA TAT GGA AAT GAG CAG ATA ATA AAG ATT ATA GCT TTT CTT TGT CAA AAG GAG ACT CAA TAT CTT TAC TCT TTC ATC AGG ACA TTG TGA CAA ATG TTT CCC CCA GAA TCA TCC GGG GAA CCA CCT CTG GCC CCA TGT ATG GCC CTG GAC AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AGC TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT ATT GGT GTC AAA GTG TCA CTG AAC TAA AGG CTG ACT TTC CAG ACA AC_X TAA GTG TGA TTT AAC ATC TAA AAC), X= A DpyDA, X= T, DpyDG (SEQ ID NO:24). Die Oligonucleotide BraFX und DpyDX (SEQ ID NO:21 und 24) wurden von IBA, Göttingen, synthetisiert und gereinigt.

Patentansprüche

1. Eine DNA-Polymerase der Familie A, die eine modifizierte Motiv-C-Sequenz und eine, im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyppolymerase, erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweist oder ein Klenow-Fragment derselben.
2. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 1, die eine bakterielle DNA-Polymerase, vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase ist, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe von Polymerasen von *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis*, *Rhodothermus obamensis* oder *Bacillus stearothermophilus*.
3. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 1 oder 2, wobei in der Motiv-c-Sequenz QVH in Position 879-881, bezogen auf das in SEQ ID NO: 2 gezeigte Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase, wenigstens ein Aminosäurerest, vorzugsweise Q879 und/oder H881 durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt wurde.
4. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 3, wobei der lipophile Aminosäurerest ausgewählt ist aus Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met und Trp, vorzugsweise ausgewählt ist aus Gly, Ala, Val, Leu und Ile und besonders bevorzugt die Motiv-C-Sequenz QVH ersetzt ist durch die Sequenzen LVL oder LVG.
5. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 3,
 - (i) die eine Taq-Polymerase mit der in SEQ ID NO:4 gezeigten Sequenz ist, in der die Sequenz QVH in Position 782-784 durch LVL oder LVG ersetzt ist oder
 - (ii) die ein Klenow-Fragment mit der in SEQ ID NO:2 gezeigten Sequenz ist, in der die Sequenz QVH in Position 879-881 durch LVL oder LVG ersetzt ist.
6. Eine DNA-Sequenz die für eine DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 codiert.

7. Ein Vektor, der die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 6 enthält.
8. Eine Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Anspruch 7 transformiert ist und/oder eine DNA gemäß Anspruch 6 aufweist.
9. Ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß Anspruch 8 und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand.
10. Verwendung der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 in diagnostischen und molekularbiologischen Verfahren, einschließlich allel-spezifischer PCR, DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung usw.
11. Ein Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe, umfassend die Verwendung einer DNA-Polymerase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, enthaltend folgende Schritte:
 - a) Zugabe von
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten,
 - einer DNA-Polymerase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5,
 - mindestens einem diskriminierenden Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei für jede nachzuweisende Sequenzvariante einer Target-Nukleinsäure ein Primer zugegeben wird, welcher eine Sequenz komplementär zur nachzuweisenden Sequenzvariante aufweist, und wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3' terminalen-, 3' proxi-terminalen-, oder 3' proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest des diskriminierenden Primers ist,

- mindestens einem weiteren Primer, der komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension eines diskriminierenden Primers ist;
 - b) Durchführung einer Primer-Extensionsreaktion, wobei ein Verlängerungsprodukt des diskriminierenden Primers im Wesentlichen nur dann erhalten wird, wenn die Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält;
 - c) Trennung der Produkts der Primer-Extensionsreaktion von der Template Nukleinsäure;
 - d) Zyklische Wiederholung der Schritte b) und c) zum Erhalt eines Amplifikationsproduktes, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion; und
 - e) Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer Sequenzvariante aufgrund der An- oder Abwesenheit des Amplifikationsproduktes.
13. Das Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Schritte b) - e) als Real Time PCR oder Real Time RT-PCR durchgeführt werden.
14. Ein Kit zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe gemäß Anspruch 11 bis 13, enthaltend wenigstens eine DNA-Polymerase gemäß Ansprüchen 1 bis 5.
15. Der Kit nach Anspruch 14, zusätzlich enthaltend einen oder mehrere der folgenden Komponenten
- einen oder mehrere diskriminierende Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3' terminalen-, 3' proxi-terminalen-, oder 3' proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest der diskriminierenden Primer ist,
 - einen oder mehrere weitere Primer, die komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension der diskriminierenden Primer sind,
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphate,
 - Puffer

- Quantifizierungsreagenzien, insbesondere interkalierende Reagenzien oder in der kleinen Furche anbindende Reagenzien und
- Polymerase-blockierende Antikörper, insbesondere TaqBlock.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

<120> Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter
Fehlpaarungs-Diskriminierung

<130> 040123de JH/BM

<140>

<141>

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2787

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: E. coli
Wildtyp Klenow Fragment der DNA Polymerase 1

<400> 1

```

atggttcaga tccccaaaa tccacttata cttgtagatg gttcatctta tctttatcgc 60
gcataatcac cgtttccccc gctgactaac agcgcaggcg agccgaccgg tgcgatgtat 120
ggtgtcctca acatgctgcg cagtctgata atgcaatata aaccgacgca tgcagcgggtg 180
gtctttgacg ccaagggaaa aacctttcgt gatgaactgt ttgaacatta caaatcacat 240
cgcccgccaa tgccggacga tctgcgtgca caaatcgaa ccttgacgcg gatggttaaa 300
gcgatgggac tgccgctgct ggcggtttct ggcgtagaag cggacgacgt tatcggtact 360
ctggcgcgcg aagccgaaaa agccggggcg cgggtgctga tcagcactgg cgataaagat 420
atggcgcgag tggtagacgc aaatattacg cttatcaata ccattgacgaa taccatcttc 480
ggaccggaag aggtggtgaa taagtacggc gtgcccgcag aactgatcat cgatttcctg 540
gcgctgatgg gtgactcctc tgataacatt cctggcgtag cgggcgtcgg tgaaaaaac 600
gcgcaggcat tgctgcaagg tcttgccgga ctggatacgc tgtatgcgca gccagaaaa 660
attgctgggt tgagcttcgg tggcgcgaaa acaatggcag cgaagctcga gcaaaacaaa 720
gaagttgctt atctctcata ccagctggcg acgattaaaa ccgacgttga actggagctg 780
acctgtgaac aactggaagt gcagcaaccg gcagcgggaag agttgttggg gctgttcaaa 840
aagtatgagt tcaaacgctg gactgctgat gtcgaagcgg gcaaatggtt acaggccaaa 900
ggggcaaaac cagccgcgaa gccacaggaa accagtgttg cagacgaagc accagaagtg 960
acggcaacgg tgattttcta tgacaactac gtcaccatcc ttgatgaaga aacactgaaa 1020
gcgtggattg cgaagctgga aaaagcgccg gtattttgcat ttgataccga aaccgacagc 1080
cttgataaca tctctgctaa cctggctcgg ctttcttttg ctatcgagcc aggcgtagcg 1140
gcataatatt cggttgctca tgattatctt gatgcgccc atcaaattct tcgagagcgt 1200
gcactcgagt tgctaaaacc gctgctggaa gatgaaaagg cgctgaaggt cgggcaaaac 1260
ctgaaatcag atcgcggtat tctggcgaa tacggcattg aactgcgtgg gattgcgttt 1320
gataccatgc tggagtccta cattctcaat agcgttgccg ggcgtcacga tatggacagc 1380
ctcgcggaac gttggttgaa gcacaaaacc atcacttttg aagagattgc tggtaaaggc 1440
aaaaatcaac tgacctttta ccagattgcc ctogaagaag cggacgtta cgccgccgaa 1500
gatgcagatg tcaccttgca gttgcatctg aaaatgtggc cggatctgca aaaacacaaa 1560
gggcccgttg acgtcttcga gaatatcgaa atgcgcgtgg tgccggtgct ttcacgcatt 1620
gaacgtaacg gtgtgaagat cgatccgaaa gtgctgcaca atcattctga agagctcacc 1680
cttcgtctgg ctgagctgga aaagaaagcg catgaaattg caggtgagga atttaacctt 1740
tcttcacca agcagttaca aaccattctc ttgaaaaaac agggcattaa accgctgaag 1800
aaaacgccgg gtggcgcgcc gtcaacgtcg gaagaggtac tggagaagaa ggcgctggac 1860
tatccgttgc caaaagtgat tetggagtat cgtggtctgg cgaagctgaa atcgacctac 1920

```

```

accgacaagc tgccgctgat gatcaacccg aaaaccgggc gtgtgcatac ctcttatcac 1980
caggcagtaa ctgcaacggg acgtttatcg tcaaccgatc ctaacctgca aaacattccg 2040
gtgcgtaacg aagaaggctc tgcgtatccg caggcggtta ttgcgccaga ggattatgtg 2100
attgtctcag cggactactc gcagattgaa ctgcgcatta tggcgcatct ttcgcgtgac 2160
aaaggcttgc tgaccgcatt cgcggaagga aaagatatcc accgggcaac ggcggcagaa 2220
gtgttttggt tgccactgga aaccgtcacc agcgagcaac gccgtagcgc gaaagcgatc 2280
aactttggtc tgatttatgg catgagtgtc ttcggtctgg cgcggcaatt gaacattcca 2340
cgtaaagaag cgcagaagta catggacctt tacttcgaac gctaccctgg cgtgctggag 2400
tatatggaac gcaccogtgc tcaggcgaaa gagcagggtc acgttgaaac gctggacgga 2460
cgccgtctgt atctgccgga tatcaaatcc agcaatgggt ctcgtcgtgc agcggctgaa 2520
cgtgcagcca ttaacgcgcc aatgcaggga accgccgccg acattatcaa acgggcgatg 2580
attgccgttg atgcgtgggt acaggctgag caaccgcgtg tacgtatgat catgcaggta 2640
cacgatgaac tgggtattga agttcataaa gatgatgttg atgccgtcgc gaagcagatt 2700
catcaactga tggaaaactg taccgcgtct gatgtgccgt tgctggtgga agtggggagt 2760
ggcgaaaact gggatcaggc gcactaa

```

2787

<210> 2.

<211> 928

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: E.coli
Klenow Fragment der DNA Polymerase 1

<400> 2

```

Met Val Gln Ile Pro Gln Asn Pro Leu Ile Leu Val Asp Gly Ser Ser
  1             5             10             15

```

```

Tyr Leu Tyr Arg Ala Tyr His Ala Phe Pro Pro Leu Thr Asn Ser Ala
  20             25             30

```

```

Gly Glu Pro Thr Gly Ala Met Tyr Gly Val Leu Asn Met Leu Arg Ser
  35             40             45

```

```

Leu Ile Met Gln Tyr Lys Pro Thr His Ala Ala Val Val Phe Asp Ala
  50             55             60

```

```

Lys Gly Lys Thr Phe Arg Asp Glu Leu Phe Glu His Tyr Lys Ser His
  65             70             75             80

```

```

Arg Pro Pro Met Pro Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Glu Pro Leu His
  85             90             95

```

```

Ala Met Val Lys Ala Met Gly Leu Pro Leu Leu Ala Val Ser Gly Val
  100            105            110

```

```

Glu Ala Asp Asp Val Ile Gly Thr Leu Ala Arg Glu Ala Glu Lys Ala
  115            120            125

```

```

Gly Arg Pro Val Leu Ile Ser Thr Gly Asp Lys Asp Met Ala Gln Leu
  130            135            140

```

```

Val Thr Pro Asn Ile Thr Leu Ile Asn Thr Met Thr Asn Thr Ile Leu
  145            150            155            160

```

```

Gly Pro Glu Glu Val Val Asn Lys Tyr Gly Val Pro Pro Glu Leu Ile

```

165 170 175
 Ile Asp Phe Leu Ala Leu Met Gly Asp Ser Ser Asp Asn Ile Pro Gly
 180 185 190
 Val Pro Gly Val Gly Glu Lys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Gln Gly Leu
 195 200 205
 Gly Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Ala Glu Pro Glu Lys Ile Ala Gly Leu
 210 215 220
 Ser Phe Arg Gly Ala Lys Thr Met Ala Ala Lys Leu Glu Gln Asn Lys
 225 230 235 240
 Glu Val Ala Tyr Leu Ser Tyr Gln Leu Ala Thr Ile Lys Thr Asp Val
 245 250 255
 Glu Leu Glu Leu Thr Cys Glu Gln Leu Glu Val Gln Gln Pro Ala Ala
 260 265 270
 Glu Glu Leu Leu Gly Leu Phe Lys Lys Tyr Glu Phe Lys Arg Trp Thr
 275 280 285
 Ala Asp Val Glu Ala Gly Lys Trp Leu Gln Ala Lys Gly Ala Lys Pro
 290 295 300
 Ala Ala Lys Pro Gln Glu Thr Ser Val Ala Asp Glu Ala Pro Glu Val
 305 310 315 320
 Thr Ala Thr Val Ile Ser Tyr Asp Asn Tyr Val Thr Ile Leu Asp Glu
 325 330 335
 Glu Thr Leu Lys Ala Trp Ile Ala Lys Leu Glu Lys Ala Pro Val Phe
 340 345 350
 Ala Phe Asp Thr Glu Thr Asp Ser Leu Asp Asn Ile Ser Ala Asn Leu
 355 360 365
 Val Gly Leu Ser Phe Ala Ile Glu Pro Gly Val Ala Ala Tyr Ile Pro
 370 375 380
 Val Ala His Asp Tyr Leu Asp Ala Pro Asp Gln Ile Ser Arg Glu Arg
 385 390 395 400
 Ala Leu Glu Leu Leu Lys Pro Leu Leu Glu Asp Glu Lys Ala Leu Lys
 405 410 415
 Val Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Asp Arg Gly Ile Leu Ala Asn Tyr Gly
 420 425 430
 Ile Glu Leu Arg Gly Ile Ala Phe Asp Thr Met Leu Glu Ser Tyr Ile
 435 440 445
 Leu Asn Ser Val Ala Gly Arg His Asp Met Asp Ser Leu Ala Glu Arg
 450 455 460
 Trp Leu Lys His Lys Thr Ile Thr Phe Glu Glu Ile Ala Gly Lys Gly
 465 470 475 480

Lys Asn Gln Leu Thr Phe Asn Gln Ile Ala Leu Glu Glu Ala Gly Arg
 485 490 495
 Tyr Ala Ala Glu Asp Ala Asp Val Thr Leu Gln Leu His Leu Lys Met
 500 505 510
 Trp Pro Asp Leu Gln Lys His Lys Gly Pro Leu Asn Val Phe Glu Asn
 515 520 525
 Ile Glu Met Pro Leu Val Pro Val Leu Ser Arg Ile Glu Arg Asn Gly
 530 535 540
 Val Lys Ile Asp Pro Lys Val Leu His Asn His Ser Glu Glu Leu Thr
 545 550 555 560
 Leu Arg Leu Ala Glu Leu Glu Lys Lys Ala His Glu Ile Ala Gly Glu
 565 570 575
 Glu Phe Asn Leu Ser Ser Thr Lys Gln Leu Gln Thr Ile Leu Phe Glu
 580 585 590
 Lys Gln Gly Ile Lys Pro Leu Lys Lys Thr Pro Gly Gly Ala Pro Ser
 595 600 605
 Thr Ser Glu Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Leu Asp Tyr Pro Leu Pro
 610 615 620
 Lys Val Ile Leu Glu Tyr Arg Gly Leu Ala Lys Leu Lys Ser Thr Tyr
 625 630 635 640
 Thr Asp Lys Leu Pro Leu Met Ile Asn Pro Lys Thr Gly Arg Val His
 645 650 655
 Thr Ser Tyr His Gln Ala Val Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Thr
 660 665 670
 Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Asn Glu Glu Gly Arg Arg
 675 680 685
 Ile Arg Gln Ala Phe Ile Ala Pro Glu Asp Tyr Val Ile Val Ser Ala
 690 695 700
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Met Ala His Leu Ser Arg Asp
 705 710 715 720
 Lys Gly Leu Leu Thr Ala Phe Ala Glu Gly Lys Asp Ile His Arg Ala
 725 730 735
 Thr Ala Ala Glu Val Phe Gly Leu Pro Leu Glu Thr Val Thr Ser Glu
 740 745 750
 Gln Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Asn Phe Gly Leu Ile Tyr Gly Met
 755 760 765
 Ser Ala Phe Gly Leu Ala Arg Gln Leu Asn Ile Pro Arg Lys Glu Ala
 770 775 780

Gln Lys Tyr Met Asp Leu Tyr Phe Glu Arg Tyr Pro Gly Val Leu Glu
 785 790 795 800

Tyr Met Glu Arg Thr Arg Ala Gln Ala Lys Glu Gln Gly Tyr Val Glu
 805 810 815

Thr Leu Asp Gly Arg Arg Leu Tyr Leu Pro Asp Ile Lys Ser Ser Asn
 820 825 830

Gly Ala Arg Arg Ala Ala Ala Glu Arg Ala Ala Ile Asn Ala Pro Met
 835 840 845

Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Arg Ala Met Ile Ala Val Asp
 850 855 860

Ala Trp Leu Gln Ala Glu Gln Pro Arg Val Arg Met Ile Met Gln Val
 865 870 875 880

His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val His Lys Asp Asp Val Asp Ala Val
 885 890 895

Ala Lys Gln Ile His Gln Leu Met Glu Asn Cys Thr Arg Leu Asp Val
 900 905 910

Pro Leu Leu Val Glu Val Gly Ser Gly Glu Asn Trp Asp Gln Ala His
 915 920 925

<210> 3

<211> 2499

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp Taq
 Polymerase

<400> 3

atgaggggga	tgtgtcccct	ctttgagccc	aagggccggg	tcctcctggt	ggacggccac	60
cacctggcct	accgcacctt	ccacgccctg	aagggcctca	ccaccagccg	gggggagccg	120
gtgcaggcgg	tctacggctt	cgccaagagc	ctcctcaagg	ccctcaagga	ggacggggac	180
gcggtgatcg	tggtctttga	cgccaaggcc	ccctccttcc	gccacgaggc	ctacgggggg	240
tacaaggcgg	gcccggcccc	cacgccggag	gactttcccc	ggcaactcgc	cctcatcaag	300
gagctggtgg	acctcctggg	gctggcgcg	ctcgagggtc	cgggctacga	ggcggacgac	360
gtcctggcca	gcctggccaa	gaaggcggaa	aaggagggct	acgagggtccg	catcctcacc	420
gccgacaaa	acctttacca	gctcctttcc	gaccgcattc	acgtcctcca	ccccgagggg	480
tacctcatca	ccccggcctg	gctttgggaa	aagtacggcc	tgaggcccga	ccagtggggc	540
gactaccggg	ccctgaccgg	ggacgagtcc	gacaaccttc	ccgggggtcaa	gggcatcggg	600
gagaagacgg	cgaggaagct	tctggaggag	tgggggagcc	tggaagccct	cctcaagaac	660
ctggaccggc	tgaagcccgc	catccgggag	aagatcctgg	cccacatgga	cgatctgaag	720
ctctcctggg	acctggccaa	ggtgcgcacc	gacctgcccc	tggagggtgga	cttcgccaaa	780
aggcgggagc	ccgaccggga	gaggcttagg	gcctttctgg	agaggcttga	gtttggcagc	840
ctcctccacg	agttcggcct	tctggaaagc	cccaaggccc	tggaggaggc	cccctggccc	900
ccgcccgaag	gggccttcgt	ggcctttgtg	ctttcccgcg	aggagcccat	gtgggcccga	960
cttctggccc	tggccgcccgc	cagggggggc	cgggtccacc	gggcccccca	gccttataaa	1020


```

gccctcaggg acctgaagga ggcgcggggg cttctcgcca aagacctgag cgttctggcc 1080
ctgaggggaag gccttggcct cccgccgggc gacgaccca tgctcctcgc ctacctcctg 1140
gacccttcca acaccacccc cgaggggggtg gcccggcgct acggcgggga gtggacggag 1200
gagggcggggg agcgggccgc cctttccgag aggtctctcg ccaacctgtg ggggaggctt 1260
gaggggggagg agaggctcct ttggctttac cgaggaggtg agaggccctt ttccgctgtc 1320
ctggcccaca tggaggccac ggggggtgcgc ctggacgtgg cctatctcag ggccttgtcc 1380
ctggaggtgg ccgaggagat cgcccgccctc gaggccgagg tcttcgcgct ggccggccac 1440
cccttcaacc tcaactcccg ggaccagctg gaaagggctc tctttgacga gctagggtt 1500
cccgccatcg gcaagacgga gaagaccggc aagcgctcca ccagcgccgc cgtcctggag 1560
gcccctcggg agggccaccc catcgtggag aagatcctgc agtaccggga gctaccaag 1620
ctgaagagca cctacattga ccccttgccg gacctcatcc accccaggac gggccgcctc 1680
cacaccgct tcaaccagac ggccacggcc acgggcaggc taagtagctc cgtatccaac 1740
ctccagaaca tcccgcctcg caccgcgctt gggcagagga tccgcccggc cttcatcgcc 1800
gaggaggggt ggctattggt ggccctggac tatagccaga tagagctcag ggtgctggcc 1860
cacctctccg gcgacgagaa cctgatccgg gtcttcagg agggcgggga catccacag 1920
gagaccgcca gctggatggt cggcgctccc cgggaggcgg tggacccct gatgcgccc 1980
gcggccaaga ccatcaactt cggggctcctc tacggcatgt cggcccaccg cctctectag 2040
gagctagcca tcccttacga ggaggcccag gccttcattg agcgctactt tcagagcttc 2100
cccaagggtg gggcctggat tgagaagacc ctggaggagg gcaggaggcg ggggtacgtg 2160
gagaccctct tcggccgccc ccgctacgtg ccagacctag agggccgggt gaagagcgtg 2220
cgggaggcgg ccgagcgcat ggccttcaac atgcccgtcc agggcaccgc cgccgacctc 2280
atgaagctgg ctatggtgaa gctcttcccc aggtctggag aaatgggggc caggatgctc 2340
cttcaggctc acgacgagct ggtcctcgag gcccaaaag agaggcgga ggcggtggcc 2400
cggctggcca aggaggtcat ggaggggtg tatcccctgg ccgtgccctt ggaggtggag 2460
gtggggatag gggaggactg gctctccgcc aaggagtga 2499

```

<210> 4

<211> 832

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp Taq Polymerase

<400> 4

```

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1               5               10               15
Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
                20               25               30
Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35               40               45
Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
 50               55               60
Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
 65               70               75               80
Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
                85               90               95
Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 100               105               110

```

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 120 125
 Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 135 140
 Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 170 175
 Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190
 Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205
 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu

420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560
 His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575
 Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685
 Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
 690 695 700
 Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Gly Tyr Val
 705 710 715 720
 Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg
 725 730 735

Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
 740 745 750

Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
 755 760 765

Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
 770 775 780

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
 785 790 795 800

Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
 805 810 815

Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 820 825 830

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 5

gtacgtatga tcatgnnnnn nnnngatgaa ctggtattt

39

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Downstream-Primer

<400> 6

gctaattaag cttggctgca ggc

23

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Antisense-Primer

<400> 7

tacatggacc tttacttoga acgc

24

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
FVL20TH

<400> 8

acaaaatacc tgtattcctt

20

<210> 9

<211> 90

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize
TFVL90A

<400> 9

gacatcatga gagacatcgc ctctgggcta ataggactac ttctaactctg taagagcaga 60
tccctggaca ggcaaggaat acaggtatctt 90

<210> 10

<211> 90

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize
TFVL90G

<400> 10

gacatcatga gagacatcgc ctctgggcta ataggactac ttctaactctg taagagcaga 60
tccctggaca ggcgaggaat acaggtatctt 90

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur
Detektion des SNPs in der humanen genomische
Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz

<400> 11

acaaaatacc tgtattcctn

20

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize der humanen genomischen Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz; n=g, Wildtypmatrize; n=a, mutante Matrize

<400> 12
 gatccctgga caggcagga atacaggtat tttgt

35

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur Detektion der humanen somatische BRAF-T1796A-Mutation

<400> 13
 gacccactcc atcgagattt ct

22

<210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp Matrize des BRAF Gens; w= t, Wildtypmatrize; w = a, mutante Matrize

<400> 14
 ggtctagcta cagwgaaatc tcgatggagt gggtc

35

<210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur Detektion der humanen Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A

<400> 15
 gtttttagatg ttaaatcaca cttat

25

<210> 16



<211> 38
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize
 des humanen DPyD; r = g, Wildtypmatrize; r = a,
 mutante Matrize

<400> 16
 ctttcacagac aacrttaagtg tgattttaaca tctaaaac

38

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur
 Detektion der humanen sauren Ceramidase Mutation
 A107G

<400> 17
 cgttggtcct gaaggaggat

20

<210> 18
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize der
 humanen sauren Ceramidase; r = a, Wildtypmatrize;
 r = g, mutante Matrize

<400> 18
 aaatcaacot rttcttccttc aggaccaacg tac

33

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primersonde
 Braff

<400> 19
 gaccactcc atcgagattt ct

22

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: umgekehrter
Primer für BRAF

<400> 20

agaggaaaga tgaagtacta tg

22

<210> 21

<211> 239

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Zielmatrize
BrafX; w = a, Braf A (Wildtyp); w = t, BrafT
(Mutante)

<400> 21

caactgttca aactgatggg accaactcca tcgagatttc wctgtagcta gaccaaaatc 60
 acctatTTTT actgtgaggt cttcatgaag aaatatact gaggtgtagt aagtaaagga 120
 aaacagtaga tctcattttc ctatcagagc aagcattatg aagagtttag gtaagagatc 180
 taatttctat aattctgtaa tataatattc tttaaaacat agtacttcat ctttcctct 239

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primersonde
DpyDT

<400> 22

gttttagatg ttaaatacaca cttat

25

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: umgekehrter
Primer für DpyDT

<400> 23

aaagctcctt tctgaatatt gag

23

<210> 24

<211> 300

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Zielmatrize
 DpyDX; r = a, DpyDA (Wildtyp); r = t, DpyDT
 (Mutante)

<400> 24

```

aaaatgtgag aagggacctc ataaaaatat tcatatggaa atgagcagat aataaagatt 60
atagcttttc tttgtcaaaa ggagaotcaa tatctttact ctttcatcag gacattgtga 120
caaatgtttc ccccagaatc atccggggaa ccacctctgg ccccatgtat ggccctggac 180
aaagctcctt tctgaatatt gagctcatca gtgagaaaac ggctgcatat tgggtgtcaaa 240
gtgtcactga actaaaggct gactttccag acaacrtaa tgtgatttaa catctaaaac 300

```

<210> 25

<211> 7043

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: pTTQ18::Taq

<400> 25

```

gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgtttttcca 60
atgatgagca ctttttaaagt tctgctatgt ggogcggtat tatcccgat tgacgccggg 120
caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcaacca 180
gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 240
accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag 300
ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg 360
gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 420
acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta 480
atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggct 540
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg tatcattgca 600
gcactggggc cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag 660
gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat 720
tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt 780
taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa 840
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac ccogtagaaa agatcaaagg atcttcttga 900
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgttgc ttgcaacaaa aaaaaccacc gctaccagcg 960
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1020
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagcgt agttaggcca ccacttcaag 1080
aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc 1140
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1200
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgg aacgacctac 1260
accgaactga gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttoc cgaagggaga 1320
aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1380
ccagggggaa acgcctggtt tctttatagt cctgtogggg ttcgccacct ctgacttgag 1440
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 1500
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgcgtta 1560
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgcg 1620
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cgggaagagcg cccaatacgc 1680
aaaccgcctc tcccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gaattaatto tcatgtttga 1740
cagcttatca tcgactgcac ggtgcaccaa tgcctctggc gtcaggcagc catcggaagc 1800
tgtggtatgg ctgtgcaggt cgtaaatcac tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc 1860
ccgttctgga taatgttttt tgcgcgcaca tcataacggt tctggcaaat attctgaaat 1920
gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 1980
ttcacacagg aaacagcgat gaattcgggg atgctgcccc tctttgagcc caagggccgg 2040
gtcctcctgg tggacggcca ccacctggcc taccgcacct tccacgcctt gaagggcctc 2100
accaccagcc ggggggagcc ggtgcaggcg gtctacggct tcgccaagag cctcctcaag 2160
gccctcaagg aggacgggga cgcggtgatc gtggtctttg acgccaaggc cccctccttc 2220

```

cgccacgagg	cctacggggg	gtacaaggcg	ggccggggccc	ccacgccgga	ggactttccc	2280
cggcaactcg	ccctcatcaa	ggagctgggtg	gacctctctg	ggctggcgcg	cctcgagggtc	2340
ccgggctacg	aggcggacga	cgtcctggcc	agcctggcca	agaaggcgga	aaaggagggc	2400
tacgaggtcc	gcctcctcac	cgccgacaaa	gacctttacc	agctcctttc	cgaccgcac	2460
cacgtcctcc	accccgaggg	gtacctcatc	accccgccct	ggctttggga	aaagtacggc	2520
ctgaggcccg	accagtgggc	cgactaccgg	gccctgaccg	gggacgagtc	cgacaacctt	2580
cccgggggtca	agggcatcgg	ggagaagacg	gcgaggaagc	ttctggagga	gtggggggagc	2640
ctggaagccc	tcctcaagaa	cctggaccgg	ctgaagcccg	ccatccggga	gaagatcctg	2700
gcccacatgg	acgatctgaa	gctctcctgg	gacctggcca	aggtgcgcac	cgacctgccc	2760
ctggagggtgg	acttggccaa	aaggcgggag	cccgcaccgg	agaggcttag	ggcctttctg	2820
gagaggcttg	agtttggcag	cctcctccac	gagttcggcc	ttctggaaag	cccccaaggcc	2880
ctggaggagg	ccccctggcc	cccgccggaa	ggggccttcg	tgggctttgt	gctttcccg	2940
aaggagccca	tgtggggcca	tcttctggcc	ctggccggccg	ccaggggggg	ccgggtccac	3000
cgggcccccg	agccttataa	agccctcagg	gacctgaagg	aggcgccggg	gcttctcgcc	3060
aaagacctga	gcgttctggc	cctgagggaa	ggcctttggc	tcccggcccg	cgacgacccc	3120
atgctcctcg	cctacctcct	ggaccttcc	aacaccacc	ccgagggggt	ggcccgcg	3180
tacggcgggg	agtggacgga	ggaggcgggg	gagcgggccg	ccctttccga	gaggctcttc	3240
gccaacctgt	gggggagggt	tgagggggag	gagaggctcc	tttggcttta	ccgggagggtg	3300
gagaggcccc	tttccgctgt	cctggcccac	atggaggcca	cgggggtg	cctggacgtg	3360
gcctatctca	gggccttgtc	cctggagggtg	gcgaggaga	tgcgcccgct	cgaggccgag	3420
gtcttccgcc	tggccggcca	cccttcaac	ctcaactccc	gggaccagct	ggaaaagggtc	3480
ctctttgacg	agctagggct	tcccgcctac	ggcaagacgg	agaagaccgg	caagcgctcc	3540
accagcgccg	ccgtcctgga	ggcctcgcg	gaggccacc	ccatcgtgga	gaagatcctg	3600
cagtaccggg	agctcaccaa	gctgaagagc	acctacattg	accccttgcc	ggacctcatc	3660
caccccagga	cgggcgcgct	ccacaccg	ttcaaccaga	cggccaacgg	cacgggcagg	3720
ctaagtagct	ccgatcccaa	cctccagaac	atccccgtcc	gcaccccgct	tgggcagagg	3780
atccgcgggg	ccttcacg	cgaggagggg	tggctattgg	tggccctgga	ctatagccag	3840
atagagctca	gggtgctggc	ccacctctec	ggcgacgaga	acctgatccg	ggtcttccag	3900
gagggggggg	acatccacac	ggagaccg	agctggatgt	tccgcgtccc	ccgggaggcc	3960
gtggaccccc	tgatgcgcg	ggcgcccaag	acctcaact	tgggggtcct	ctacggcatg	4020
tgcggccacc	gcctctccca	ggagctagcc	atcccttacg	aggaggcca	ggccttcaat	4080
gagcgctact	ttcagagctt	ccccaaagg	cgggcctgga	ttgagaagac	cctggaggag	4140
ggcaggaggc	gggggtacgt	ggagaccctc	ttcgcccgcc	gccgctacgt	gccagacctt	4200
gaggcccggg	tgaagagcgt	gcgggaggcg	gcgagcgca	tggccttcaa	catgcccgtc	4260
cagggcaccg	ccgcgcacct	catgaagctg	gctatggtga	agctcttccc	caggctggag	4320
gaaatggggg	ccaggatgct	ccttcagggtc	cacgacgagc	tggctcctga	ggcccaaaaa	4380
gagaggggcg	agggcgtggc	ccggctggcc	aaggagggtc	tggagggggt	gtatcccctg	4440
gccgtgcccc	tggagggtga	gggggggata	ggggaggact	ggctctccgc	caaggagtga	4500
tagatcctct	agagtcgacc	tgcaggatg	caagcttggc	actggccgtc	gttttacaa	4560
gtcgtgactg	ggaaaacctt	ggcgttaccc	aacttaatcg	ccttgcagca	catccccctt	4620
tgcgcagctg	gcgtaatagc	gaagaggccc	gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgca	4680
gcctgaatgg	cgaatggcgc	ctgatgcggt	atcttctcct	tacgcactctg	tgcggtatctt	4740
cacaccgcat	aaattccctg	ttttggcgga	tgagagaaga	ttttcagcct	gatacagatt	4800
aaatcagaac	gcagaagcgg	tctgataaaa	cagaatttgc	ctggcggcag	tagcgcggtg	4860
gtcccacctg	accccatgcc	gaactcagaa	gtgaaacgcc	gtagcgccga	tggtagtggtg	4920
gggtctcccc	atgcgagagt	agggaaactgc	caggcatcaa	ataaaacgaa	aggctcagtc	4980
gaaagactgg	gcctttcgtt	ttatctgttg	tttgtcgggtg	aacgctctcc	tgagtaggac	5040
aaatccgcgg	ggagcggtat	tgaacgttgc	gaagcaacgg	cccgagggtg	ggcgggcagg	5100
acgccccgca	taaaactgcc	ggcatcaaat	taagcagaag	gccatcctga	cggatggcct	5160
ttttgcgttt	ctacaaactc	ttcctgtcgt	catatctaca	agccatcccc	ccacagatac	5220
ggtaaaactg	cctcgttttt	gcacagga	agcagggaat	ttatggtgca	ctctcagtag	5280
aatctgctct	gatgaagcga	tcttaagcca	gccccacac	ccgccaacac	ccgctgacgc	5340
gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	caagctgtga	ccgtctccgg	5400
gagctgcatg	tgtcagagg	tttcaccgtc	atcaccgaaa	cgcgcgagac	gaaagggcct	5460
cgtgatacgc	ctatttttat	aggttaatgt	catgataata	atggtttctt	agacgtgagg	5520
ttctgtaccc	gacaccatcg	aatgggtgca	aacctttcgc	ggtatggcat	gatagcgccc	5580
ggaagagagt	caattcagg	tgggtgaatgt	gaaaccagta	acgttatacg	atgtcgcaga	5640
gtatgccggg	gtctcttatc	agaccgtttc	ccgcgtgggtg	aaccaggcca	gccacgtttc	5700

```

tgcgaaaacg cgggaaaaag tggaaagcggc gatggcggag ctgaattaca ttcccaaccg 5760
cgtggcacaa caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt ggcggttgcca cctccagtct 5820
ggccctgcac gcgcgcgcgc aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgcgc atcaactggg 5880
tgccagcgtg gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta aagcggcgg 5940
gcacaatctt ctgcgcgaac gcgtcagtg gctgatcatt aactatccgc tggatgacca 6000
ggatgccatt gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatttc ttgatgtctc 6060
tgaccagaca cccatcaaca gtattatttt ctcccatgaa gacggtacgc gactgggcgt 6120
ggagcatctg gtgcgatttg gtcaccagca aatcgcgcgt ttagcgggcc cattaagttc 6180
tgtctcggcg cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat ctactcgcga atcaaattca 6240
gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac aaaccatgca 6300
aatgctgaat gagggcatcg ttcccatgat gatgctggtt gccaacgatc agatggcgc 6360
gggcgcaatg cgcgccatta ccgagtcggg gctgcgcgtt ggtgcggata tctcggtagt 6420
gggatacgac gataccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgttaacca ccatcaaaaa 6480
ggattttcgc ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg ctgcaactct ctcagggcca 6540
ggcgggtgaag ggcaatcagc tgttgcccg ctactggtg aaaagaaaaa ccaccctggc 6600
gccaataacg caaacgcct ctcccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg 6660
acaggtttcc gcactggaa ggggcagtg agcgcaacgc aattaatgta agttagtcga 6720
ctcattaggg accccaggct ttacacttta tgcttccgac ctgcaagaac ctcacgtcag 6780
gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt 6840
caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 6900
ggaagagtat gagtatcoaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 6960
gccttccgtg ttttgctcac ccagaaacgc tgggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 7020
tgggtgcacg agtgggttac atc 7043

```

<210> 26

<211> 10534

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: pQE30

<400> 26

```

ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca 60
attgtgagcg gataagagct ctttagtatt ttttaataaa acgaaacact cgcctattgt 120
taatattatc taagttaaca ctgcgcctatt caatttcaca cagaattcat taaagaggag 180
aaatttaacta tgagaggatc gcatcaccat caccatcacg gatccgttaa agtgtgtctt 240
aagtaatttc tctcttttaa ttgatactct cctagcgtag tggtagtggg agtgcotagg 300
acggcaacgg tgattttctta tgacaactac gtcaccatcc ttgatgaaga aacactgaaa 360
gcgtggattg cgaagtgcgc ttgccactaa agaatactgt tgatgcagtg gtaggaacta 420
cttctttgtg actttcgcac ctaacgcttc ctggaaaaag cgccggtatt tgcatttgat 480
accgaaaccg acagccttga taacatctct gctaacctgg tcggggacct ttttcgcggc 540
cataaacgta aactatggct ttggtgtgct gaactattgt agagacgatt ggaccagccc 600
ctttcttttg ctatcgagcc aggcgtagcg gcataatatt cggttgctca tgattatctt 660
gatgcgcccg atcaagaaa gaaaacgatag ctoggtccgc atcgccgtat ataaggccaa 720
cgagtactaa tagaactacg cgggctagtt atctctcgcg agcgtgcact cgagtgtcta 780
aaaccgctgc tggaagatga aaaggcgcgt aaggctcggc aaaactagag agcgcctcga 840
cgtgagctca acgatttttg cgacgacctt ctacttttcc gcgacttcca gcccgttttg 900
ctgaaatacg atcgcggtat tctggcgaac tacggcattg aactgcgtgg gattgcgttt 960
gataccatgc tggaggactt tatgctagcg ccataagacc gcttgatgcc gtaacttgac 1020
gcaccctaac gcaaaactat gtacgacctc tcctacattc tcaatagcgt tgccgggcgt 1080
cacgatattg acagcctcgc ggaacgttgg ttgaagcaca aaaccaggat gtaagagtta 1140
tcgcaacggc ccgcagtgct atacctgtcg gaggccttg caaccaactt cgtgttttgg 1200
atcacttttg aagagattgc tggtaaaggc aaaaatcaac tgacctttaa ccagattgcc 1260
ctcgaagaag ccggatagtg aaaacttctc taacgacctt ttccgttttt agttgactgg 1320
aaattggtct aacgggagct tcttcggcct cgttacgcgc ccgaagatgc agatgtcacc 1380
ttgcagttgc atctgaaaat gtggccggat ctgcaaaaaa acaaagcaat gcggcggcgtt 1440

```

ctacgtctac	agtggaaagt	caacgtagac	ttttacaccg	gcctagacgt	ttttgtgttt	1500
gggocgttga	acgtcttcga	gaatatogaa	atgccgctgg	tgccggtgct	ttcacgcatt	1560
gaacgtaacg	gtgtgcccgg	caacttgccag	aagctcttat	agctttacgg	cgaccacggc	1620
cacgaaagtg	cgtaacttgc	attgccacac	aagatcgatc	cgaaagtgct	gcacaatcat	1680
tctgaagagc	tcaccottcg	tctggctgag	ctggaaaaga	aagcgttcta	gctaggcttt	1740
cacgacgtgt	tagtaagact	tctcgagtgg	gaagcagacc	gactcgacct	tttctttcgc	1800
catgaaattg	caggtgagga	atttaacctt	tcttccacca	agcagttaca	aaccattctc	1860
tttgaaaaac	agggcgctact	ttaacgtcca	ctccttaaat	tggaaagaag	gtggttcgtc	1920
aatgttttgt	aagagaaact	ttttgtcccg	attaaaccgc	tgaagaaaac	gccgggtggc	1980
gcgcggtcaa	cgtcggaaga	ggtactggaa	gaactggcgc	tggactaatt	tggcgacttc	2040
ttttgoggcc	caccgcgcgg	cagttgcagc	cttctccatg	accttcttga	ccgcgacctg	2100
tatccgttgc	caaaagtgat	tctggagtat	cgtggtctgg	cgaagctgaa	atcgacctac	2160
accgacaagc	tgccgatagg	caacggtttt	cactaagacc	tcatagcacc	agaccgcttc	2220
gacttttagct	ggatgtggct	gttcgacggc	ctgatgatca	acccgaaaac	cgggcggtgtg	2280
catacctctt	atcaccaggc	agtaactgca	acgggacggt	tatcggacta	ctagtgtggc	2340
ttttggcccg	cacacgtatg	gagaatagtg	gtccgtcatt	gacgttgccc	tgcaaatagc	2400
tcaaccgtca	cgtaacctga	aaactctgca	gtgcgtaacg	aagaaggctc	tcgtatccgc	2460
caggcggttta	ttgcgagttg	gctaggattg	gacgttttgt	aaggccacgc	attgtctctt	2520
ccagcagcat	agggcggtccg	caaataacgc	ccagaggatt	atgtgattgt	ctcagcggac	2580
tactcgcaga	ttgaactgcg	cattatggcg	catctttcgc	gtgacggtct	cctaatacac	2640
taacagagtc	gcttgatgag	cgtctaactt	gacgcgtaat	accgcgtaga	aagcgcactg	2700
aaaggcttgc	tgacgcgatt	cgcggaagga	aaagatatcc	accgggcaac	ggcggcagaa	2760
gtgttttgtt	tgccattttcc	gaacgactgg	cgtaagcgcc	ttccttttct	ataggtggcc	2820
cgttgccgcc	gtcttcacaa	accaaaacgg	ctggaaaaccg	tcaccagcga	gcaacgcctg	2880
agcgcgaaag	cgatcaactt	tggctctgatt	tatggcatga	gtgctgacct	ttggcagttg	2940
tcgctcgttg	cgccatcgcg	ctttcgctag	ttgaaaccag	actaaatacc	gtactcacga	3000
ttcggctctg	cgccgcaatt	gaacattcca	cgtaaagaag	cgcagaagta	catggacctt	3060
tacttcgaac	gctacaagcc	agaccgcgcc	gttaacttgt	aaggtgcatt	tcttcgcgtc	3120
ttcatgtacc	tggaaatgaa	gcttgccgatg	cctggcggtgc	tggagtatat	ggaacgcacc	3180
cgtgctcagg	cgaaagagca	gggctacgtt	gaaacgctgg	acggaggacc	gcacgacctc	3240
atagctcttg	cgtgggcacg	agtcgcgttt	ctcgtcccca	tgcaactttg	cgactgcctc	3300
cgccgtctgt	atctgcogga	tatcaaatec	agcaatgggtg	ctcgtcgtgc	agcggctgaa	3360
cgtgcagcca	ttaaocggcg	agacatagac	ggcctatagt	ttaggtcgtt	accacgagca	3420
gcacgtcgcc	gacttgcacg	tcggtaattg	gcgcgaatgc	agggaaaccgc	cgccgacatt	3480
atcaaacggg	cgatgattgc	cgttgatgcg	tggttacagg	ctgagcgcg	ttacgtccct	3540
tggcgccggc	tgtaatatgtt	tgcccgctac	taacggcaac	tacgcacca	tgtccgactc	3600
caaccgcgtg	tacgtatgat	catgcaggta	cacgatgaac	tggatattga	agttcataaa	3660
gatgatgttg	atgccgttgg	cgacatgca	tactagtacg	tccatgtgct	acttgacctc	3720
aaacttcaag	tattttact	acaaactcgg	gtcgcgaagc	agattcatca	actgatgga	3780
aaactgtacc	gtctggatgt	gccgttgctg	gtggaaagtgg	ggagtcagcg	cttcgtctaa	3840
gtagttgact	accttttgac	atgggcagac	ctacacggca	acgaccacct	tcacccctca	3900
ggcgaaaact	gggatcaggc	gcactaagat	tcgcctgcag	ccaagcttaa	ttagctgagc	3960
ttggactcct	gttgaccgct	tttgacccta	gtccgcgtga	ttctaagcgg	acgtcggttc	4020
gaattaatcg	actogaacct	gaggacaact	tagatccagt	aatgacctca	gaactccatc	4080
tggatttgtt	cagaacgcct	ggttgccgcc	gggcgttttt	tattgatcta	ggtcattact	4140
ggagtcttga	ggtagacct	aacaagtctt	gcgagccaac	ggcggcccg	aaaaataaac	4200
gtgagaatcc	aagctagctt	ggcgagattt	tcaggagcta	aggaagctaa	aatggagaaa	4260
aaaatcactg	gatatactc	ttaggttcga	tcgaaccgct	ctaaaagtcc	tcgattcctt	4320
cgattttacc	tcttttttta	gtgacctata	accaccgttg	atataatcca	atggcatcgt	4380
aaagaacatt	ttgaggcatt	tcagtcagtt	gctcaatgta	cctattgggtg	gcaactatat	4440
agggttaccg	tagcattttct	tgtaaaactc	cgtaaaagtca	gtcaacgagt	tacatggata	4500
aaccagaccg	ttcagctgga	tattacggcc	tttttaaaga	ccgtaaaagaa	aaataagcac	4560
aagtttttgt	cggccttggt	ctggcaagtc	gacctataat	gccggaaaaa	tttctggcat	4620
ttctttttat	tcgtgttcaa	aataggccgg	ttatttca	ttcttgcccg	cctgatgaat	4680
gctcatccgg	aatttcgtat	ggcaatgaaa	gacggtgagc	tgggtgaaata	agtgtgaaga	4740
cgggcggaact	acttacgagt	aggccttaaa	gcataccgtt	actttctgcc	actcgaccac	4800
atatgggata	gtgttcaccc	ttgttacacc	gttttccatg	agcaaaactga	aacgttttca	4860
tcgctctgga	gtgaatatac	cetatcacaa	gtgggaacaa	tgtggcaaaa	ggtactcggtt	4920

tgacttttgca	aaagtagcga	gacctcactt	taccacgacg	atttcgga	gtttctacac	4980
atataattgc	aagatgtggc	gtgttacggt	gaaaacctgg	cctatatggt	gctgctaaag	5040
gccgtcaaag	atgtgtatat	aagcgttcta	caccgcacaa	tgccactttt	ggaccggata	5100
ttccctaag	ggtttattga	gaatatgttt	ttcgtctcag	ccaatccctg	ggtgagtttc	5160
accagttttg	atttaaagg	atttccaaa	taactcttat	acaaaaagca	gagtcggtta	5220
gggaccact	caaagtggtc	aaaactaaat	aacgtggcca	atatggacaa	cttcttcgcc	5280
cccgttttca	ccatgggcaa	atattatacg	caaggcgaca	aggtgttgca	ccggttatac	5340
ctgttgaaga	agcgggggca	aaagtggtag	ccgtttataa	tatgcgttcc	gctgttccac	5400
ctgatgcgc	tggcgattca	ggttcatcat	tcggtttgtg	atggcttcca	tgctcggcaga	5460
atgcttaatg	aattagacta	cggcgaccgc	taagtcgaag	tagtacggca	aacactaccg	5520
aaggtacagc	cgtcttacga	attacttaat	caacagtact	gcgatgagt	gcagggcggg	5580
gcgtaatttt	tttaaggcag	ttattgggtc	ccttaaacgc	ctgggggtgt	catgacgcta	5640
ctcaccgtoc	cgccccgcac	taaaaaaatt	ccgtcaataa	ccacgggaat	ttgcggaccc	5700
gtaatgactc	tctagcttga	ggcatcaaat	aaaacgaaag	gctcagtcga	aagactgggc	5760
ctttcgtttt	atctgcatta	ctgagagatc	gaactccgta	gtttattttg	ctttccgagt	5820
cagctttctg	accggaaag	caaaatagac	ttgtttgtcg	gtgaacgctc	tcctgagtag	5880
gacaaatcog	ccctctagag	ctgcctcgcg	cgtttcggtg	atgacaacaa	acagccactt	5940
gcgagaggac	tcctcctggt	taggcgggag	atctcgacgg	agcgcgcaaa	gccactactg	6000
ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	cagcttgtct	gtaagcggat	6060
gocgggagca	gacaaccact	tttggagact	gtgtacgtcg	agggcctctg	ccagtgtcga	6120
acagacattc	gootacggcc	ctcgtctgtt	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgtttgc	6180
gggtgtcggg	gcgcagccat	gaccagtcga	cgtagcgata	gcggacgggc	agtcccgcgc	6240
agtcgcccac	aaccgcccac	agccccgcgt	cggtactggg	tcagtgcac	gctatcgctc	6300
gtgtatactg	gcttaactat	gcggcatcag	agcagattgt	actgagagt	caccatattg	6360
ggtgtgaaat	accgccacat	atgaccgaat	tgatacgccg	tagtctcgtc	taacatgact	6420
ctcactgtgt	atacgccaca	ctttatggcg	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	6480
ggcgctcttc	cgcttctctg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgtgtct	acgcattcct	6540
cttttatggc	gtagtcgcgc	agaaggcgaa	ggagcgagtg	actgagcgac	gcgagccagc	6600
ttcggtctgc	gcgagcggta	tcagctcact	caaaggcggt	aatacggtta	tccacagaat	6660
caggggataa	gcgagaagcc	gacgcgcgtc	gccatagtcg	agtgagtttc	cgccattatg	6720
ccaataggtg	tcttagtccc	ctattgcgtc	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	6780
aggccaggaa	ccgtaaaaag	gocgcgttgc	tggcggtttt	ccatactttc	ttgtacactc	6840
gtttttccgg	cgttttccgg	tccttggcat	ttttccggcg	caacgaccgc	aaaaaggtat	6900
ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	6960
cgacaggact	ataaacggag	gcggggggac	tgctcgtagt	gttttttagct	gcgagttcag	7020
tctccaccgc	tttgggctgt	cctgatattt	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	7080
tcgtgcgtc	tcctgttccg	accctgcgc	ttaccggata	cctgtctatg	gtccgcaaa	7140
ggggaccttc	gagggagcac	gcgagaggac	aaggctggga	cggcgaaatg	cctatggaca	7200
ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	tttctcatag	ctacgcgtgt	aggtatctca	7260
gttcggtgta	ggtcggggcg	aaagagggaa	gcccttcgca	ccgcgaaaga	gtatcgagt	7320
cgacatccat	agagtcaagc	cacatccagc	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	7380
cccccgttca	gcccgaccgc	tgogccttat	ccggtaacta	tcgtcaagcg	aggttcgacc	7440
cgacacacgt	gcttgggggg	caagtccggc	tggcgacgcg	gaataggcca	ttgatagcag	7500
ttgagtccaa	cccggttaaga	caogacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	7560
ttagcagagc	gaggttaactc	aggttgggac	attctgtgct	gaatagcggt	gaccgtcgtc	7620
ggtgaccatt	gtcctaatacg	tctcgtccca	atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	7680
ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagga	cagtatttgg	tatctttacat	ccgccacgat	7740
gtctcaagaa	cttcaccacc	ggattgatgc	cgatgtgac	ttcctgtcat	aaaccataga	7800
gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	7860
aaaccaccgc	tggtacgcga	gacgacttcg	gtcaatggaa	goccttttct	caaccatcga	7920
gaactaggcc	gtttgttttg	tggcgaccat	gcggtgggtt	ttttgtttgc	aagcagcaga	7980
ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	atcctttgat	cttttcgcca	caaaaaaaac	8040
aaacgttctg	cgtctaattgc	gcgtcttttt	ttcctagagt	tcttctagga	aactagaata	8100
ctacggggtc	tgacgctcag	tggaaogaaa	actcacgtta	agggattttg	gtcatgagat	8160
tatcaaaaaag	gatctgatgc	cccagactgc	gagtcacctt	gctttttgagt	gcaattccct	8220
aaaaccagta	ctctaatagt	ttttcctaga	tcacctagat	ccttttaaat	taaaaatgaa	8280
gttttaaatc	aatctaaagt	atataatgagt	aaacttgggc	tgacaagtgg	atctaggaaa	8340
atttaatttt	tacttcaaaa	tttagttaga	tttcatatat	actcatttga	accagactgt	8400

```

gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca 8460
tagttgcctg actcccaatg gttacgaatt agtcactccg tggatagagt cgctagacag 8520
ataaagcaag taggtatcaa cggactgagg ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg 8580
gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacggcag cacatctatt 8640
gatgctatgc cctcccgat ggtagaccgg ggtcacgacg ttactatggc gctctgggtg 8700
gctcacccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cgggaagggc gagcgcagaa 8760
gtggtcctgc aacttcaggt ggccgaggtc taaatagtcg ttatttggtc ggtcggcctt 8820
cccggctcgc gtcttcacca ggacgttgaa tatccgcctc catccagtct attaatgtt 8880
gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaatagg cggaggtagg 8940
tcagataatt aacaacggcc cttcgatctc attcatcaag cggtaatta tcaaaccgct 9000
acgttggttc cattgctaca ggcatcgttg tgctacgctc gtcgtttggt atggcttcat 9060
tcagctccgg ttccctgcaa caacggtaac gatgtccgta gcaccacagt gcgagcagca 9120
aaccataocg aagtaagtcg aggccaaagg aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca 9180
tggttgcaaa aaaagcgggt agtccttcg gtccctccgat cgttggtgct agttccgctc 9240
aatgtactag ggggtacaac acgttttttc gccaatcgag gaagccagga ggctagcaac 9300
tcagaagtaa gttggcgcga gtgttatcac tcatggttat ggagcactg cataattctc 9360
ttactgtcat gccatagctc tcattcaacc ggcgtcacaa tagtgagtac caataccgct 9420
gtgacgtatt aagagaatga cagtacggtc ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 9480
actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccgcgacc gagttggcat tctacgaaa 9540
gacactgacc actcatgagt tgggtcagta agactcttat cacatacgcc gctggctcaa 9600
gctcttgccc ggogtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 9660
tcatcattgg aaaaccgaga acgggcccga gttatgccct attatggcgc ggtgtatcgt 9720
cttgaaatct tcacgagtag taaccttttg gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct 9780
taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccacaaga agccccgctt 9840
ttgagagttc ctagaatggc gacaactcta ggtcaagcta cattgggtga gcacgtgggt 9900
actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 9960
aaaatgccgc aaaatgact agaagtcgta gaaatgaaa gtggtcgcaa agaccactc 10020
gtttttgtcc ttccgtttta cggcggtttt aggggaataag ggcgacacg aaatgttgaa 10080
tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcaggctcct tattcccgct 10140
gtgcctttac aacttatgag tatgagaagg aaaaagttat aataacttcg taaatagtc 10200
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 10260
ttccgcgcac atttccaata acagagtact cgcctatgta taaaacttaca taaatctttt 10320
tatttgttta tccccaggc gcgtgtaaag cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa 10380
ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgat caccaggggt tttcacgggt 10440
gactgcagat tctttggtta taatagtact gtaattggat atttttatcc gcatagtgtc 10500
ggccctttcg tcttcaccgc ggaaagcaga agtg 10534

```

<210> 27

<211> 11

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Matrizenausschnitt (SEQ ID NO: 14); w = t,
Wildtyp ; w = a, mutante Matrize

<400> 27

ctaaagwgac a

11

<210> 28

<211> 11

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Matrizenausschnitt (SEQ ID NO: 16); r = g,
Wildtyp; r = a, Mutante

<400> 28
gtgaatrcaa c

11

<210> 29
<211> 11
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Matrizenausschnitt (SEQ ID NO: 12); r = t,
Wildtyp; r = a, Mutante

<400> 29
taaggaycgg a

11

Zusammenfassung

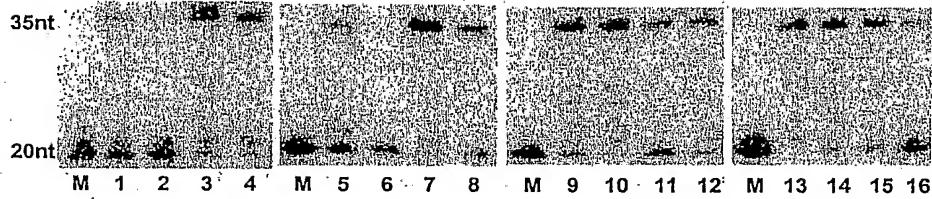
Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Polymerasen mit einer speziellen Mutation, die eine erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweisen, deren Herstellung und Verwendung. Die thermostabilen DNA-Polymerasen mit dieser Mutation sind besonders für diagnostische und molekularbiologische Verfahren, z.B. allelspezifische PCR geeignet.

-1/4-

a

Wildtyp (QVH):

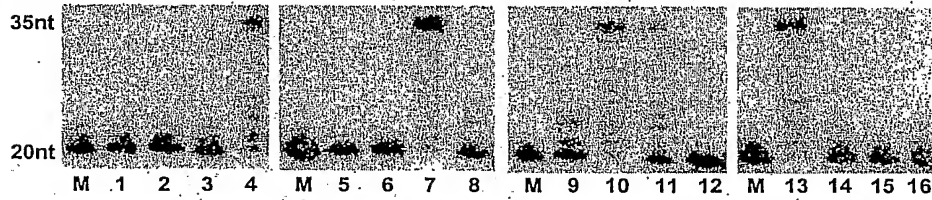
X= - A A A A - G G G G - C C C C - T T T T
Y= - A G C T - A G C T - A G C T - A G C T



b

LVG:

X= - A A A A - G G G G - C C C C - T T T T
Y= - A G C T - A G C T - A G C T - A G C T



c

LVL:

X= - A A A A - G G G G - C C C C - T T T T
Y= - A G C T - A G C T - A G C T - A G C T

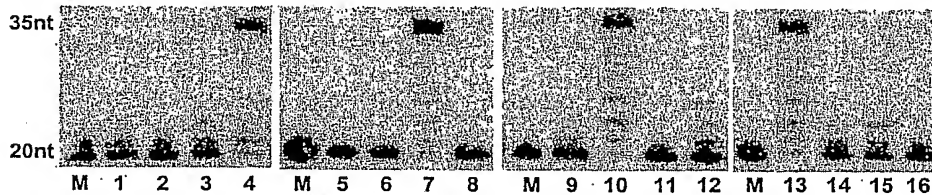


Fig.1

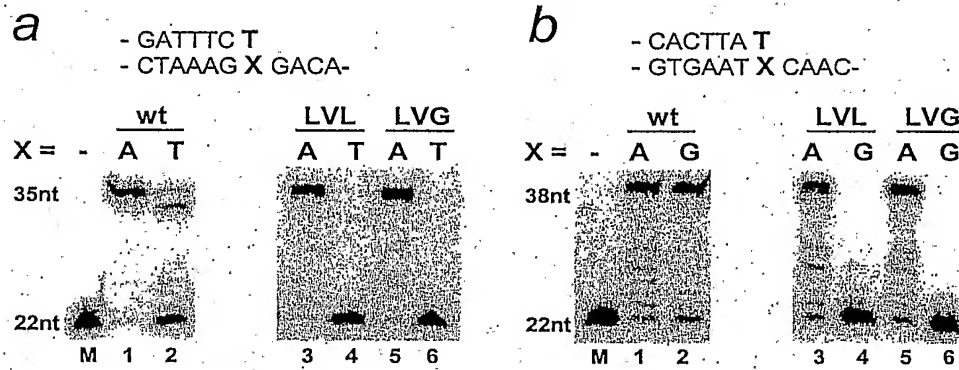


Fig.2

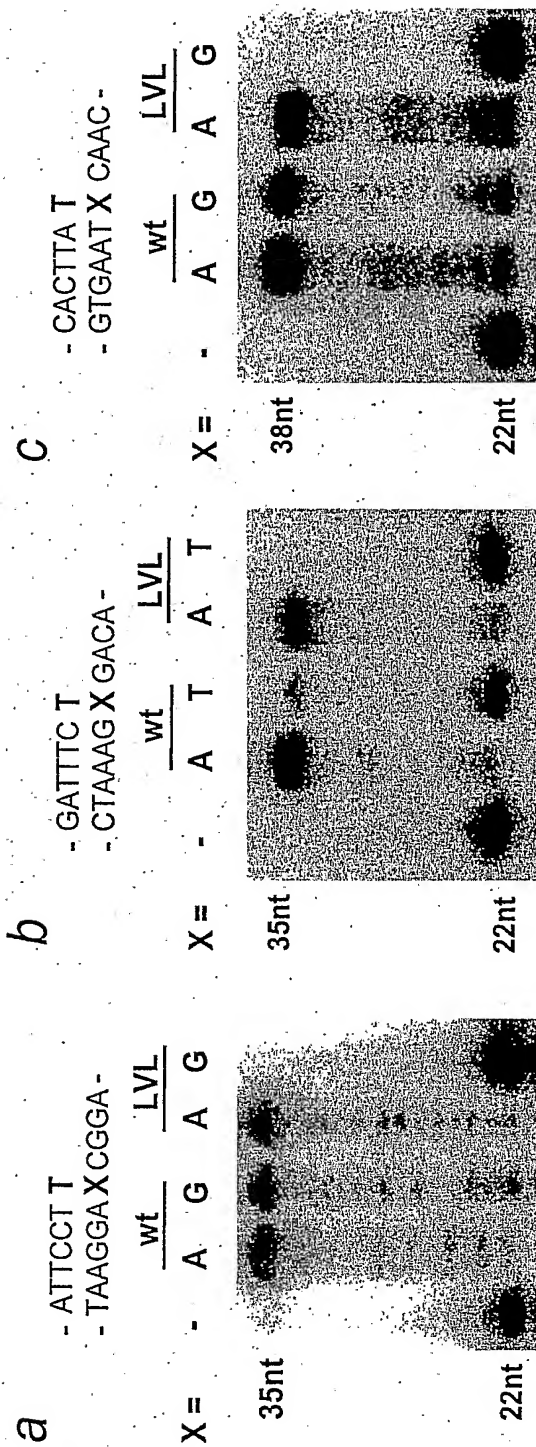


Fig.3

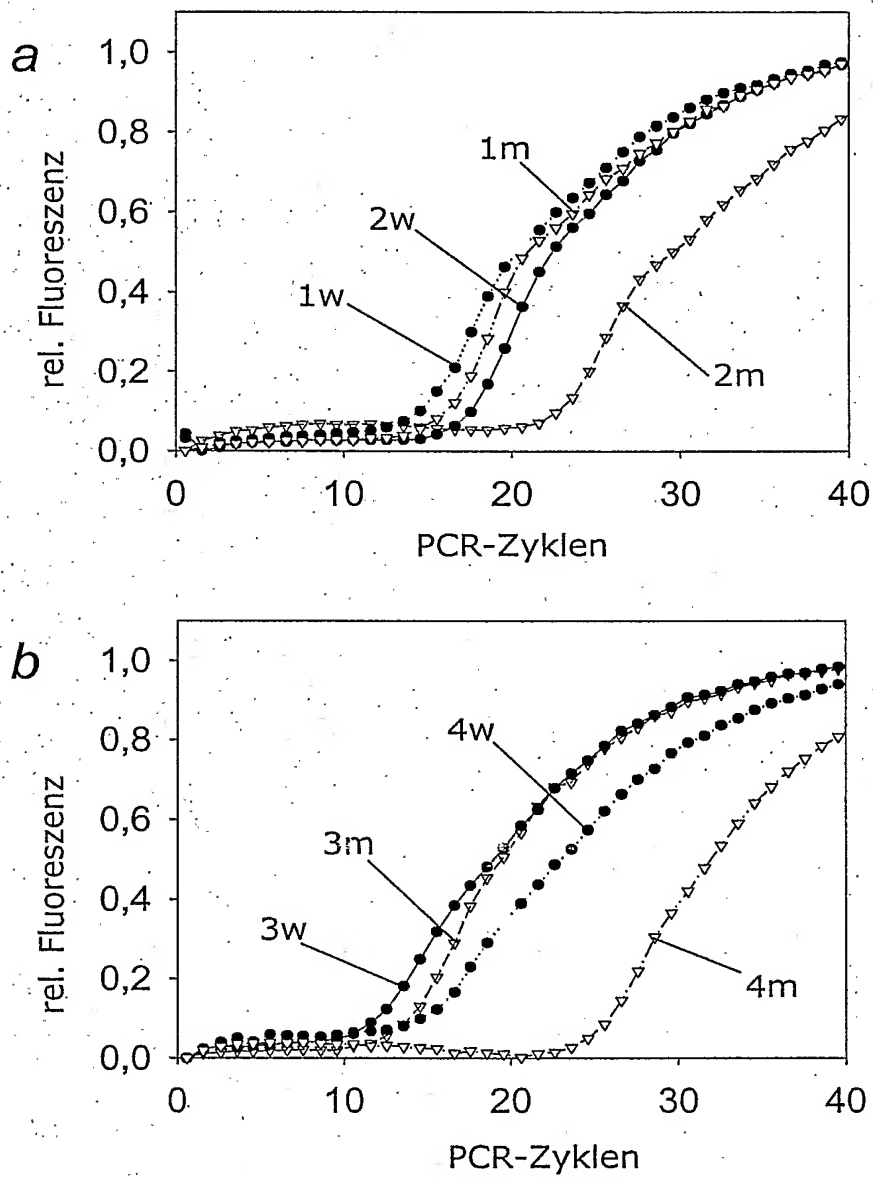


Fig.4